

---

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## LES THÉORIES PARASITAIRES DU CANCER

PAR LE D<sup>r</sup> A. BORREL

(Avec les planches III, IV et V.)

---

Jadis on désignait sous le nom de *tumeurs* les productions pathologiques les plus diverses, et ce n'est que peu à peu, par les progrès des études microbiologiques, que charbon, morve, tubercule, lèpre, actinomycose sont sortis du cadre confus des tumeurs pour entrer dans le domaine mieux défini des maladies infectieuses.

Aujourd'hui encore, la classe des tumeurs comprend des néoplasies très différentes par leur structure histologique, leur malignité, et certainement aussi par leur cause étiologique. — L'expression vague et vulgaire de « cancer » ou tumeur cancéreuse ne correspond à aucune production bien définie; elle sert à désigner toute tumeur maligne, récidivante, susceptible de généralisation, et capable d'entraîner la mort par une cachexie plus ou moins précoce: sarcome, épithéliome, carcinome, avec leurs diverses variétés. — De tout temps, les tumeurs malignes ont appelé l'attention des pathologistes par leur caractère *infectant*, par les métastases qu'elles provoquent dans les ganglions lymphatiques ou les organes internes à la manière des maladies virulentes; on a toujours comparé le cancer à la tuberculose; on a décrit la cellule cancéreuse à côté de la cellule tuberculeuse; on a admis l'hérédité cancéreuse au même titre que l'hérédité tuberculeuse, et de même que jadis on expliquait la genèse des tubercules par une déviation pathologique des éléments des tissus, beaucoup d'anatomo-pathologistes veulent encore expli-

quer l'évolution des tumeurs cancéreuses par quelque désorientation cellulaire spontanée.

Pourtant les observations cliniques les plus récentes semblent bien démontrer qu'il y a des pays, des rues, des maisons à cancer; le caractère contagieux, épidémique même, de certaines formes de cancer semble bien établi, et depuis que le rôle des micro-organismes dans la genèse des maladies infectieuses a été mis en évidence, on a voulu trouver le *microbe du cancer* : expression particulièrement impropre lorsqu'on l'emploie au singulier, car il est bien évident que les diverses variétés du cancer ne pourront jamais être expliquées par une cause étiologique unique; il doit y avoir *des* microbes du cancer et il peut exister des tumeurs sans microbes.

Les premiers essais de démonstration, au début de la bactériologie, n'ont pas été heureux, et les observations de Scheuerlen, Rappin, Koubassof, etc., qui avaient cru isoler, cultiver, inoculer le microbe du cancer, sont tombées dans l'oubli : il s'agissait de bactéries banales.

## I

### THÉORIE COCCIDIENNE

Il y a quelque dix ans, la question du parasitisme des tumeurs cancéreuses a pris une orientation toute différente, et on a voulu incriminer comme parasites, dans les tumeurs épithéliales, non plus des bactéries, mais des Sporozoaires.

Les cancers épithéliaux sont surtout caractérisés par la prolifération excessive d'une cellule du type épithélial : épithélium de revêtement ou épithélium glandulaire; cette cellule se multiplie dans les foyers métastatiques et dans les ganglions lymphatiques avec le type de la tumeur initiale. Or, on ne connaît pas, jusqu'ici du moins, de bactérie capable de causer, soit par sa présence dans la cellule, soit indirectement par une action à distance au moyen d'une toxine, la prolifération anormale des épithéliums; les bactéries connues, les champignons, lorsqu'ils donnent naissance à des productions pathologiques, déterminent la néoformation ou plus exactement l'accumulation de cellules du type mésodermique (cellules épithélioïdes) et donnent ou des granulomes ou des tubercules.



D'autre part, on connaissait depuis longtemps des parasites appartenant au groupe des Sporozoaires, des Coccidies, qui vivent de préférence dans les cellules épithéliales, qui provoquent l'hypertrophie de ces cellules et souvent, chez certains animaux, donnent naissance à de véritables tumeurs : adénome villeux des canaux biliaires du lapin par le *Coccidium oviforme*, adénome de l'intestin par la coccidie du mouton (Nocard).

L'hypothèse d'un Sporozoaire, d'une coccidie parasite des cancers épithéliaux était séduisante ; on a cherché à l'établir en se basant surtout sur des analogies morphologiques.

Neisser <sup>1</sup> le premier, en 1888, avait décrit des coccidies dans les petites tumeurs inoculables qui caractérisent l'acné varioliforme ou *molluscum contagiosum* de l'homme. Pour lui, les figures si particulières de dégénérescence protoplasmique qu'on trouve dans ces boutons épithéliaux, et qui aboutissent à la formation de globes cornés expulsés dans la cavité de la petite tumeur, devaient être considérés comme des coccidies typiques ; mais les figures de l'auteur n'entraînent pas la conviction, et l'étude de cette question, entreprise par de nombreux observateurs, a montré l'inexactitude de cette interprétation. D'ailleurs, il ne s'agit pas ici de tumeurs cancéreuses.

Pfeiffer <sup>2</sup> parle de coccidies pour la première fois dans le cancer en 1888, mais les figures qu'il donne à l'appui de cette hypothèse n'ont rien qui puisse entraîner la conviction.

Avec les travaux de l'école de Malassez, de Darier <sup>3</sup>, de Wickham <sup>4</sup>, en 1889, la question est nettement posée, et ces auteurs décrivent comme coccidies, dans le tissu épithélial des tumeurs, des corps ronds intra ou extra-cellulaires, avec une membrane réfringente à double contour, qu'ils comparent aux formes enkystées de la coccidie du lapin.

Darier les signale dans une maladie cutanée spéciale, connue depuis sous le nom de psorospermosse folliculaire végétante ; Wickham les décrit avec détail dans la maladie de Paget ;

1. NEISSER, Ueber das Epithelioma (sive Molluscum contagiosum), *Zeitschrift f. Dermatologie*, 1888.

2. PFEIFFER, Beiträge zur Kenntniss der pathogenen Gregarinen, *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. III et V, 1888.

3. DARIER, De la psorospermosse folliculaire végétante, *Archiv. de Dermatologie*, 1889, n° 7, *Société de Biologie*, 1889, avril, p. 294.

4. WICKHAM, Maladie de Paget, Thèse de Paris, 1890.



Vincent<sup>1</sup> les signale avec une méthode de coloration spéciale dans un cas d'épithélium pavimenteux.

Les descriptions très explicites données des pseudo-parasites ont permis d'établir rapidement et d'une façon définitive leur vraie nature : il s'agissait non pas de parasites, mais de cellules épithéliales à évolution particulière<sup>2</sup>.

Les caractères assignés au noyau de ces formations suffisent pour éloigner l'idée d'un parasite sporozoaire : on a affaire à un noyau de cellule épithéliale. — La membrane d'enveloppe, qui donne à ces cellules l'apparence de kystes étrangers au tissu, résulte ordinairement du tassement des filaments de la cellule engainante ou des cellules voisines malpighiennes, suivant qu'on a une formation endogène ou une invagination cellulaire.

A l'intérieur du pseudo-kyste, sphérique ou ovalaire, se trouve une masse protoplasmique entourant le noyau, et rattachée à la capsule par une série de filaments radiaires qui signent encore mieux la véritable nature du pseudo-parasite. De pareilles cellules évoluent, dégénèrent au sein du tissu épithélial, et peuvent fournir les apparences les plus variées.

*Le parasite, dans cette première période, était une cellule épithéliale.*

L'attention étant appelée du côté des Sporozoaires, de nombreux observateurs ont décrit comme parasites tout ce qui leur paraissait un peu anormal dans les coupes : le *Rhopalocephalus carcinomatosus*, de Korotneff<sup>3</sup>, date de la fin de cette période, et n'a pas trouvé un accueil favorable de la part des pathologistes.

Russell<sup>4</sup>, en 1890, avait aussi signalé, comme formes parasitaires dans les tumeurs, des amas de boules sphériques de dimensions variables, situées dans le stroma conjonctif et caractérisées par une affinité spéciale pour les matières colorantes, d'où le nom de *corpuscules à fuchsine*.

Ces boules, qu'il est facile de retrouver dans des lésions pathologiques diverses, cancer, sarcome, syphilis, tubercule, etc.,

1. VINCENT, Sur la présence d'éléments semblables aux psorospermies dans un cas d'épithélioma pavimenteux, *Soc. de Biol.*, 1890.

2. BORREL, Sur la signification des figures décrites comme coccidies dans l'Epithélioma, *Arch. de méd. expérimentale*, 1890, t. II.

3. KOROTNEFF, *Centralb. f. Bact. u. Parasit.*, Bd. XIII, 1893.

4. RUSSELL, The characteristic organism of cancer. *Brit. med. J.* I., 1890, n° 1562.



ne montrent aucune structure, et donnent tout à fait l'impression de boules de dégénérescence hyaline. — Nous verrons qu'elles ont été interprétées d'abord comme des Sporozoaires, puis comme des levures.

Dans une deuxième période qui commence avec le travail de Thoma<sup>1</sup>, les figures données à l'appui de la théorie coccidienne sont d'une tout autre nature.

Il s'agit d'inclusions intra-cellulaires, de corps ronds, isolés ou multiples, dans l'intérieur de la cellule cancéreuse; on les trouve surtout dans les épithéliums du type glandulaire, ils sont rares dans les tumeurs du type malpighien, et on a voulu les rattacher à des formes déjà décrites depuis longtemps et désignées par Virchow sous le nom de cellules physaliphores.

Ces corps ronds ou mieux ces vacuoles intra-cellulaires, suivant la technique employée, ont été plus ou moins bien caractérisés; on a, de tous les côtés, cherché à établir leur nature parasitaire, et essayé de décrire des stades d'évolution analogues à ceux que l'on connaissait chez les Sporozoaires. — Il y a eu de nombreux malentendus dans la discussion, et si les partisans du parasitisme n'ont jamais pu établir la nature exacte des corps qu'ils décrivaient comme parasites, leurs adversaires, dans leurs critiques, ont souvent visé des figures qui jamais n'ont été décrites comme Sporozoaires.

A cette période correspondent les travaux de Thoma, de Nils Sjöbring<sup>2</sup>, de Soudakewitch<sup>3</sup>, de Foa<sup>4</sup>, de Ruffer<sup>5</sup> avec ses collaborateurs Walker et Plimmer, de Podwyssotzky<sup>6</sup>, etc.

Vues rétrospectivement, les formations invoquées par les auteurs de cette seconde période ne nous montrent que des analogies superficielles avec les coccidies. Il faut bien avouer que la plupart s'expliquent très bien par des modifications

1. THOMA, Ueber eigenartige parasitare Organismen in den Epithelzellen der Carcinome, *Forstchr. d. med.*, 1889, Bd. VII page 413.

2. SJÖBRING, *Fortsch. d. Med.*, 1890, Bd. VIII, pag. 529.

3. SOUDAKEWITCH, *Annales Inst. Pasteur*, 1892, t. VI, pages 145 et 545.

4. FOA, Ueber die krebssparasiten, *Centr. f. Bact.*, 1892, B. XII, n° 6.

5. RUFFER, *Brit. med. Journal*, 1892, page 993.

RUFFER et PLIMMER, Sur le mode de reproduction des parasites du cancer, *Soc. de Biol.*, 1893, page 836.

6. PODWYSSOTZKI et SAWTCHENKO, Ueber Parasitismus bei Carcinomen, *Centr. f. Bact.*, 1892, Bd. XI, page 491.



protoplasmiques, en rapport avec des phénomènes de sécrétion, et aboutissant à la formation de vacuoles intra-cellulaires isolées ou multiples; elles donnent souvent des figures très compliquées et régulières, simulant des formes de division d'un parasite. — Dans ces vacuoles se trouvent des substances à divers états de condensation, et, le plus souvent, il s'agit de mucus.

Les caractères de coloration de ces pseudo-parasites, d'après Foa, Soudakewitch, etc., la métachromatie après l'action de la safranine ou de la safranine-hématoxyline, caractérisent la formation des substances muqueuses.

Ruffer, avec une méthode de coloration différente, par le Biondi-Heidenhain, a voulu surtout mettre en évidence un parasite dans l'intérieur de ces vacuoles; il a cherché à établir la présence d'un noyau caractéristique d'un protozoaire, mais ce corps central, pseudo-amibe, n'est pas toujours présent, il a été insuffisamment caractérisé et mal défini jusqu'à la publication d'un travail important de Sawtchenko<sup>1</sup> en 1895.

Ce travail marque une nouvelle période dans la question des parasites du cancer, parce que, grâce à une technique excellente et à un matériel favorable, l'auteur a pu étudier beaucoup mieux que ses prédécesseurs un certain nombre d'inclusions cellulaires qu'il a considérées d'abord comme des formes parasitaires, et qui, il faut bien le reconnaître, sont très comparables aux stades jeunes et intra-cellulaires de la coccidie du lapin.

Pour Sawtchenko, le parasite se présente, le plus souvent, sous la forme d'un petit corps logé dans une vacuole de la cellule cancéreuse; souvent cette vacuole contient du mucus métachromatique, et le parasite est la cause de la dégénération partielle de la cellule.

Le parasite est constitué par un petit amas de protoplasma sans membrane d'enveloppe, il montre un noyau semblable au noyau des sporozoaires, avec un karyosome unique. Ce parasite est capable d'évolution; il grossit, le noyau se divise, et autour de chaque nouveau grain chromatique s'isole une portion de protoplasma; puis chaque nouveau parasite se loge dans une vacuole, et une même cellule peut être infectée par

1. SAWTCHENKO, *Bibliotheca Medica*, 1895, Abth. D. Heft IV.



un grand nombre de parasites ; il s'agirait de stades analogues à ceux que l'on observe dans l'évolution endogène d'une coccidie (stade à *mérozoïtes* de Simond, *schizogonie* de Schaudinn : Plaque III, fig. 1 à 5).

Ce travail, irréprochable au point de vue technique, est certainement la tentative la plus sérieuse faite pour démontrer la présence de Sporozoaires dans le cancer. Les parties centrales de certaines des figures de Soudakewitch, Ruffer correspondent probablement aux parasites de Sawtchenko, mais la technique mieux appropriée qu'a employée ce dernier savant lui a permis de mieux illustrer la ressemblance des figures qu'il décrit avec les stades d'évolution d'un Sporozoaire ; ici il ne s'agit pas d'une dégénérescence banale, ni d'un processus de désintégration cellulaire ; il ne peut être question de phénomènes de chromatolyse, de destruction de leucocytes ayant pénétré dans l'intérieur d'une cellule cancéreuse. La cellule est en parfait état ; tout semble parler en faveur d'un corps amiboïde parasite, de quelque chose de vivant.

Pourtant, ici encore, il n'y a probablement pas de parasites ; j'ai pu, sur des préparations plus favorables, suivre l'évolution de ces corps, me convaincre qu'il s'agit là encore d'une évolution atypique d'un élément de la cellule cancéreuse, la *sphère attractive* ou mieux l'*archoplasma*, pour employer un terme de cytologie qui nous permettra de rattacher cette évolution à une évolution normale.

Lorsqu'on étudie la formation du spermatozoïde chez le cobaye, on constate dans les spermatocytes de premier ordre, à côté du noyau, une sphère archoplasmique nettement individualisée, dans laquelle se trouvent un ou deux centrosomes en diplocoques. (Pl. III, fig. 6 a.)

Par la fixation au Flemming, et coloration au rouge de Magenta suivi de picro-indigo-carmin, le protoplasma de la sphère est coloré en bleu foncé et les centrosomes sont colorés en rouge. — Puis apparaissent dans la sphère, par voie de division, une grande quantité de corpuscules centrosomiques qui ont les réactions colorantes des centrosomes initiaux (fig. 6 b, b', c). Plus tard, ces corpuscules, toujours inclus dans l'archoplasma ou *idiosome* (Meves), grossissent et leur nombre diminue : il se fait comme une fusion qui aboutit à un gros corps chromatique



unique, entouré par une auréole d'archoplasma coloré en bleu (fig. 6 d.) ; c'est là l'origine de la coiffe du spermatozoïde.

Déjà à ce moment, le cil vibratile inséré sur un des centrosomes a fait son apparition ; l'idiosome vient s'appliquer contre le noyau (fig. 6 e), et paraît l'attirer fortement : des prolongements archoplasmiques, émis par l'idiosome, isolent le noyau dans la cellule (e), tandis que le centrosome porteur du cil vibratile vient s'accoler à l'autre pôle du noyau, et le spermatozoïde avec sa coiffe est comme énucléé de la cellule mère par un mécanisme sur lequel il est inutile d'insister ici. (Fig. 6 f, g.)

Il y a donc là toute une évolution de l'archoplasma, et nos observations faites avec des méthodes de coloration différentes de celles de Meves<sup>1</sup>, confirment absolument celles de ce dernier.

Bröman<sup>2</sup> a, tout récemment, signalé la multiplication des centrosomes dans l'idiosome des grandes cellules spermatiques de *Bombinator igneus*.

Heidenhain<sup>3</sup>, dans les grandes cellules à noyau polymorphe de la moelle osseuse du lapin, a signalé le développement considérable des groupes centrosomiques ; il constate jusqu'à 90 et 100 grains centrosomiques. (Pl. III, fig. 7.)

Dans les ovules de jeune cobaye, le corps vitellin représente aussi ce même idiosome, et j'ai pu y mettre en évidence les centrosomes.

Tous ces faits, tirés de l'évolution normale, nous montrent que, dans la cellule, certaines portions peuvent subir une évolution très compliquée sur laquelle l'attention des cytologistes commence à être appelée. (Voir à ce sujet la revue très complète de Prenant, *Journal de l'Anatomie*, 34 et 35.)

L'archoplasma et le centrosome paraissent jouer en particulier un rôle très important dans les phénomènes de sécrétion cellulaire (Zimmermann).

Nous allons trouver des faits de même ordre et plus compliqués encore dans l'évolution de certaines cellules cancéreuses.

Les figures dont il va être question correspondent incontestablement aux parasites de Sawtchenko, et j'ai reproduit, Pl. III, fig. 1, 2, 3, 4, 5, les dessins de l'auteur, pour faciliter la compa-

1. MEVES, *Archiv. f. Micr. Anat.* Bd. LIV, 1899.

2. BRÖMAN, *Anat. Anzeiger*, 1900.

3. *Archiv. f. mic. Anat.* Bd. XVIII, 1894.



raison. (Les nécessités du tirage des planches ont modifié légèrement la coloration des figures reproduites.)

Pour étudier à ce point de vue un peu délicat les cellules cancéreuses, il faut de toute nécessité se préoccuper d'une fixation des éléments aussi parfaite que possible, et des fragments de la tumeur doivent être immergés dans les fixateurs aussitôt après l'ablation.

Le liquide de Flemming ou le liquide de Hermann peuvent être employés; j'ai eu de bons résultats avec le fixateur suivant :

Eau.....	350 grammes.
Acide osmique.....	2 —
Dissoudre et ajouter :	
Acide chromique.....	3 grammes.
Chlorure de platine.....	2 —
Acide acétique.....	20 —

La fixation est toujours meilleure lorsqu'on opère à basse température. Les fixateurs à base d'acide osmique ont un pouvoir de pénétration très faible; les couches cellulaires fixées convenablement sont très peu nombreuses, il est facile de s'en rendre compte sur les coupes; on augmente la zone de fixation en immergeant les fragments dans le fixateur maintenu à la glacière.

Une expérience comparative de fixation à 0°, 15°, 30°, 45° et 60° m'a montré que, pour les fixateurs osmiques, on avait tout avantage à opérer au voisinage de 0°.

Dans tous les cas, c'est toujours près de la surface, là où le fixateur agit d'abord, que les résultats sont les meilleurs.

La méthode de coloration qui donne les meilleurs résultats est la suivante :

Les coupes étalées sur la lame sont colorées d'abord par le rouge Magenta; on peut employer ou une solution aqueuse, ou une solution anilinée, ou une solution phéniquée; avec une solution phéniquée, il suffit de quelques minutes (10-15') surtout si on opère à chaud (à 50° par exemple). On traite ensuite par le picro-indigo-carmin<sup>1</sup> (5 minutes); on lave rapidement à l'eau, on déshydrate et on décolore le rouge de Magenta par l'essence

1. Mélange de 2 volumes d'une solution forte de carmin d'indigo à 1 volume d'une solution saturée d'acide pierique.



de girofle, en suivant au microscope les progrès de la décoloration.

En examinant les coupes les plus superficielles et par suite les mieux fixées, lorsqu'on a la bonne fortune de tomber sur une tumeur qui contient des pseudo-parasites, on peut bien étudier la genèse des formes qui sont en question.

Souvent à côté du noyau, surtout dans les grandes cellules un peu hypertrophiées, on peut mettre en évidence la sphère attractive colorée en bleu foncé sur le protoplasma clair; elle contient un ou deux centrosomes (Pl. IV, fig. 4) — (comparer avec les spermatocytes du cobaye, Pl. III, fig. 6 a.) Ici, il n'est pas question de parasite, et c'est là le point de départ important non vu par Sawtchenko. Cette sphère peut contenir un plus ou moins grand nombre de corps centraux disposés en chaînettes (Pl. IV, fig. 2) ou en amas irréguliers. Une même cellule peut contenir 20 et 30 petits centrosomes, et dans les préparations on trouve ainsi beaucoup de cellules de ce type.

*Le processus qui conduit aux pseudo-parasites est toujours le même : c'est un processus de vacuolisation.* Tantôt c'est la sphère tout entière qui s'isole dans le protoplasma de la cellule; on a alors, suivant les dimensions de la sphère et du corps central, suivant le nombre des centrosomes, une pseudo-amibe plus ou moins grande, contenant soit un karyosome et un noyau unique, soit un noyau fragmenté. (Pl. IV, fig. 3, fig. 4, etc.)

Le stade le plus fréquent est celui d'une pseudo-amibe unique, avec noyau unique dans une vacuole à côté du noyau de la cellule cancéreuse. Les stades de multiplication du noyau dans le pseudo-parasite sont plus rares.

Il peut se faire aussi une individualisation de l'archoplasma autour de chaque grain centrosomique, lorsqu'il y a eu d'abord multiplication de centrosomes dans la sphère avant la vacuolisation. (Pl. IV, fig. 5.)

Tantôt la vacuolisation de l'archoplasma est partielle et ce sont là les cas les plus intéressants et les plus démonstratifs (voir Pl. III, fig. 8). A côté du noyau dans la cellule, l'archoplasma est coloré en bleu foncé et se relie par des prolongements fins au protoplasma; 3 vacuoles, développées dans la sphère même, montrent à leur intérieur des pseudo-amibes en voie de développement, et de dimensions variables; entre les vacuoles, dans



l'archoplasma, se voient très bien les grains centrosomiques non encore individualisés.

On pourrait objecter qu'il s'agit là de parasites, d'amibes, qui de préférence vont se loger et se développer dans l'archoplasma. La figure 4, Pl. IV, éloigne cette interprétation, puisque ici c'est la sphère tout entière, avec ses prolongements pseudopodiques, qui s'est entourée d'une vacuole.

Les figures 8, Pl. IV et 11, Pl. V, nous expliquent très bien le mode de formation de ces pseudo-parasites, et l'on voit, dans une cellule, un très grand nombre de grains centrosomiques tous égaux ou à peu près, dont une partie reste agglomérée en staphylocoques, tandis que déjà beaucoup de grains sont entourés de toutes petites vacuoles naissantes.

Dans la figure 8, la gradation est nettement marquée, et on voit le développement progressif des centrosomes; il y en a de tout petits à peine différenciés, il y en a un qui est déjà relativement gros ( $2\ \mu$  environ).

Il s'agit bien de quelque chose de vivant et qui se développe, mais il ne saurait être question de parasites.

On arrive à des figures tout à fait séduisantes en faveur de l'hypothèse parasitaire, et la figure 12, Pl. V, représente à s'y tromper une cellule infectée par 5 jeunes amibes, que rien au microscope ne peut différencier des stades jeunes de la coccidie du lapin (forme en œil de pigeon, décrite par von Leyden); mais ici encore la chaînette centrale des centrosomes est là pour signer la véritable origine de ces formations.

Les figures 13, 14, 15 et 16 sont du même type, et je dois avouer que pendant longtemps je les ai interprétées comme des formes parasitaires évidentes; par exemple, la fig. 10, Pl. IV, représente à s'y méprendre un des stades de multiplication des coccidies les plus typiques.

L'étude minutieuse des préparations m'éloigne complètement de l'interprétation parasitaire au sujet de toutes ces figures, et je crois qu'il s'agit ici d'une évolution très compliquée de l'archoplasma et des corps centraux dans certaines cellules cancéreuses.

Les réactions colorantes identiques employées soit dans l'étude de la cellule cancéreuse, soit dans l'étude des cellules testiculaires permettent d'interpréter d'une façon qui nous



paraît satisfaisante les figures pseudo-parasitaires si remarquables décrites par Sawtchenko.

Entre l'idiosome du spermatocyte, entre le corps vitellin de l'ovule du cobaye, l'archoplasma des cellules sécrétantes et l'archoplasma de la cellule cancéreuse, il y a des rapports évidents. Dans le testicule, l'évolution aboutit à une formation normale; dans la cellule cancéreuse, nous ne connaissons encore ni la cause ni la fin de cette évolution, qui au point de vue morphologique aboutit à des corps chromatiques énormes donnant l'impression de substances en dégénérescence. (Pl. V, fig. 18, 19, 20, 21).

La critique que nous venons de faire des travaux qui ont voulu établir la présence de Sporozoaires dans les tumeurs cancéreuses ne doit pas empêcher les recherches dans cette voie, elle ne doit pas nécessairement faire abandonner une si séduisante hypothèse. Elle montre simplement que la question est très compliquée, qu'il faut tenir grand compte des particularités de l'évolution de la cellule cancéreuse avant d'affirmer la présence de Sporozoaires dans les tumeurs.

Peut-être de nouvelles recherches dans cette voie seront-elles plus démonstratives.

Récemment Leyden et Schaudinn<sup>1</sup> ont trouvé, dans deux ascites cancéreuses (tumeurs abdominales), une amibe très bien caractérisée au point de vue zoologique, mais ils n'ont pu démontrer que la *Leydenia gemmipara* ait joué un rôle actif dans la production de la tumeur.

Schaudinn<sup>2</sup> lui-même, dans un travail postérieur, se prononce très nettement contre la théorie parasitaire et la présence de Sporozoaires dans les cellules cancéreuses.

Plus récemment encore Nils Sjöbring<sup>3</sup> a pu extraire d'une tumeur et cultiver un parasite qu'il range dans le groupe des Rhizopodes. Ces travaux attendent une confirmation.

## II

### THÉORIE BLASTOMYCÉTIENNE

Dans ces dernières années, à côté de la théorie parasitaire

1. LEYDEN et SCHAUDINN, *Sitzungsber. Akad. Wissensch, Berlin*.

2. SCHAUDINN, *Zool. Jahrb. Abth. f. Anat.*, XIII, 1900.

3. NILS SJÖBRING, *Centralbl. f. Bakt., Abth. I*, 27, 1900.



du cancer par les Sporozoaires, a pris naissance la théorie Blastomycétienne, et nous allons voir que les figures, interprétées par certains comme des coccidies ont été considérées par d'autres comme des levures. Les tumeurs cancéreuses, sarcome ou épithélioma, seraient dues au développement de levures.

La première observation qui a montré chez l'homme le rôle pathogène d'une levure est celle de Busse <sup>1</sup>.

Il s'agissait d'une tumeur ou plutôt d'un abcès du tibia, « Sarcome ramolli », a d'abord dit inexactement l'auteur, et dans cette tumeur, Busse a vu au microscope une levure, l'a cultivée et inoculée. L'inoculation aux animaux, cobaye, lapin, reproduit des tumeurs, dans le sens le plus général du mot, et elles sont constituées en majeure partie par des cellules de levure, déterminant une réaction inflammatoire et l'accumulation de cellules lymphatiques. L'auteur signale la ressemblance des cellules de levure avec les figures décrites comme coccidies par Darier, Wickham, etc. Nous savons qu'il s'agit d'une ressemblance tout à fait grossière : ce sont des éléments arrondis.

De même la tumeur produite n'a aucun rapport avec une tumeur cancéreuse. C'est ce qu'a très bien montré Curtis <sup>2</sup>, qui a eu l'occasion d'étudier un cas semblable, et a aussi isolé et inoculé une levure pathogène pour le cobaye, le rat, le lapin, etc. Toujours les tumeurs produites sont des granulomes, et la maladie est une saccharomycose.

San Felice, Roncali, etc., ont soutenu, dans de nombreux travaux, cette théorie blastomycétienne du cancer.

Ils veulent l'appuyer : 1° sur la présence d'éléments semblables aux levures dans les coupes des tumeurs ; 2° sur l'obtention de cultures de levures des cancers ; 3° sur les effets de l'inoculation aux animaux.

I. — Ces savants, partisans des levures, ne se préoccupent pas beaucoup de l'étude précise des formes microscopiques. Tout ce qui est rond et muni d'une capsule est facilement rangé dans le groupe des Blastomycètes ; ils acceptent comme levures et les figures de Darier et celles de Thoma, Soudakewitch, Ruffer, Sawtchenko, en y joignant les corps à fuchsine de Russell.

1. BUSSE, Ueber Saccharomycosis hominis, *Virchow's Archiv.*, Bd. CXL, S. 23.

BUSSE, Ueber parasitare Zelleinschlüsse. *Centralb. f. Bact.*, Bd. XVI, S. 175.

2. CURTIS, Saccharomycose humaine, ces *Annales*, 1896.

Il y a là une infinie variété de formes bien connues maintenant, d'origines très diverses, et qu'il est tout à fait impossible de considérer en bloc comme des levures.

D'ailleurs, *a priori*, il serait très difficile d'expliquer le siège intra-cellulaire d'une levure dans une cellule épithéliale; on comprend très bien la pénétration d'une coccidie ou d'une amibe dans une cellule épithéliale, mais on ne peut admettre la pénétration d'une levure.

La théorie blastomycétienne est admise par Plimmer<sup>1</sup> dans un récent travail, et cet auteur interprète comme levures les figures que jadis il avait décrites comme coccidies.

Sawtchenko<sup>2</sup> lui-même, dans un mémoire paru en 1898, passe à la théorie des levures parasites, et explique par la levure toutes ses figures d'amibes, de corpuscules-germes que nous venons de discuter.

A notre avis, *au point de vue morphologique*, les diverses variétés d'inclusions que nous avons passées en revue ne sauraient être considérées comme des levures, et la démonstration au microscope reste tout entière à faire. *S'il y a des levures dans les tumeurs cancéreuses, elles ne sont certainement pas dans les cellules épithéliales.*

II. — Les partisans de la théorie blastomycétienne réalisent facilement des cultures de levures extraites de tumeurs cancéreuses, mais la plupart des observateurs n'ont pas confirmé cette opinion, et lorsqu'on prend des précautions d'asepsie rigoureuse, lorsqu'on opère sur des pièces fraîches, on n'obtient pas de cultures. Maffucci et Sirleo<sup>3</sup> ont fait de nombreuses recherches dans ce sens; ils ont en effet quelquefois obtenu des colonies de levures, mais ils les ont considérées comme des impuretés, puisque des plaques de contrôle exposées en même temps à l'air du laboratoire ont aussi donné des colonies de levures.

III. — Les partisans de la théorie blastomycétienne s'appuient encore et surtout sur le résultat des inoculations aux animaux; cette inoculation a mis en évidence le rôle pathogène considérable des levures.

Busse, Curtis, en inoculant des levures provenant de saccha-

1. PLIMMER, *Cent. f. Bact. Abth.*, I, 1899.

2. SAWTCHENKO, *Arch. russes de Path.*, 1898.

3. MAFFUCCI et SIRLEO, *Zeitschr. f. Hygiene*, t. XXVIII.



romycoses humaines, ont obtenu des effets pathogènes, et la mort des animaux, avec production de tumeurs au lieu d'inoculation et dans différents points de l'organisme. Chez le rat, les tumeurs produites par inoculation péritonéale deviennent énormes, mais il ne s'agit nullement de tumeurs cancéreuses. L'examen microscopique montre, soit dans la tumeur primaire, soit dans les nodules de généralisation, la structure des granulomes; il est facile de mettre en évidence, dans les coupes, des levures parfaitement reconnaissables, et les figures obtenues diffèrent totalement des figures invoquées comme levures dans les cancers. Par la culture, on isole ces levures.

L'accumulation de cellules épithélioïdes, qui traduit la réaction de l'organisme, a, dans certains cas, pu faire penser à une néoformation épithéliale.

Suivant la levure, suivant l'organisme inoculé et le lieu de l'inoculation, les réactions sont un peu différentes, mais très généralement les tumeurs obtenues sont du type mésodermique, le tissu réactionnel peut même s'organiser, donner de véritables fibromes, chondromes.

Il y a là des faits très intéressants, mais qui à notre avis n'ont rien à voir avec la question du cancer.

San Felice obtient de pareilles tumeurs avec une levure, isolée d'un citron ou de fruits variés.

Podwyssotzky a obtenu, en inoculant des spores de *Plasmiodiophora brassicae*, des tumeurs qui ressemblent superficiellement à des endothéliomes.

Bosc, en inoculant des spores de *Monocystis* du lombric, a obtenu aussi des néoformations qu'il veut rapprocher des tumeurs cancéreuses.

Il est probable qu'en inoculant ainsi des corps variés difficiles à résorber, on déterminerait des tumeurs ou plutôt des pseudo-tumeurs résultant de l'évolution des cellules réactionnelles.

San Felice a surtout soutenu, dans de nombreux travaux, le rôle pathogène des blastomycètes.

Deux voies peuvent être suivies, dit-il, pour mettre en évidence le caractère infectieux des tumeurs malignes :

1° La voie directe : partir d'une tumeur cancéreuse, inoculer

des fragments, obtenir des cultures, reproduire la tumeur initiale. De ce côté aucun résultat n'a été obtenu avec certitude;

2° La voie indirecte, et celle-ci lui paraît meilleure :

Chercher et isoler des levures dans le milieu ambiant, les inoculer, produire chez les animaux des tumeurs cancéreuses.

Une espèce de blastomycète, isolée de la surface d'un fruit, le *Saccharomyces neoformans*, a surtout été étudiée par San Felice. Elle est pathogène pour un grand nombre d'espèces animales, et donne très ordinairement chez le rat, le cobaye, etc., ou une infection rapidement mortelle, où la production de granulomes. Dans ce cas la levure est facilement reconnaissable au microscope, elle abonde dans les préparations et se cultive facilement.

Les mêmes tableaux pathologiques sont obtenus avec la levure de Busse, Curtis, Plimmer, etc.

San Felice considère les résultats de l'inoculation au chien comme tout à fait démonstratifs.

Sur 59 chiens inoculés, 3 ont montré une production de tumeurs.

Le premier cas publié a été observé chez une chienne sacrifiée 4 mois après l'inoculation. Il y avait, à l'autopsie, une tumeur de la mamelle et des noyaux métastatiques dans le rein. Les dessins de l'auteur montrent qu'il s'agit d'un processus granuleux, interstitiel, d'une saccharomycose. Les levures abondent soit dans le tissu, soit dans les cellules épithélioïdes. Au point de vue morphologique, San Felice veut identifier ses levures avec les figures décrites jusqu'à lui comme coccidies. Cette opinion n'est pas soutenable.

Le deuxième cas, signalé déjà en 1896, et décrit en détail en 1898, est celui d'une chienne inoculée depuis 10 mois avec une culture de *Sacch. neoformans*, et morte cachectique. Il y avait une tumeur au point d'inoculation dans la mamelle, et des métastases dans les ganglions lymphatiques. Rien dans les autres organes. Les préparations montrent qu'il s'agit incontestablement d'un adéno-carcinome. Le tableau microscopique diffère totalement du premier cas publié, et ne peut lui être comparé.

Malheureusement, on ne trouve pas, dans les coupes, de figures que l'on puisse avec certitude considérer comme levures; les cultures sont restées stériles.

Le troisième cas publié est celui d'un chien inoculé dans le



testicule en novembre 1897, et mort en avril 1898. L'examen microscopique montre une accumulation de cellules lymphatiques en voie de division active par karyokinèse. Dans cette tumeur, comme dans la précédente, on ne voit plus les levures inoculées; la culture, d'après l'auteur lui-même, n'a donné aucun résultat.

Les faits pouvant être considérés comme positifs, avec production de vraies tumeurs, se réduisent en somme à 2 sur plus de 60 chiens inoculés, et les tumeurs obtenues sont de type histologique différent.

Pour expliquer les insuccès nombreux, San Felice doit faire intervenir des considérations de race et de prédisposition individuelle: pour expliquer l'absence de cultures provenant des tumeurs expérimentales, il doit supposer un état de la levure devenue incultivable.

Admettons qu'il ne s'agisse pas d'un simple hasard, et que les tumeurs produites sont bien le résultat de l'inoculation des levures. Peut-on en conclure que les cancers sont dus à des levures? Je crois que la conclusion dépasserait de beaucoup les faits.

Wlaeff a étudié aussi le rôle pathogène des levures, et, en les inoculant dans le péritoine d'un rat, a obtenu une fois, au milieu de tumeurs granuleuses, la production d'un adénome kystique développé aux dépens de l'épithélium intestinal inclus dans la tumeur à levure. Les levures sont parfaitement reconnaissables dans le tissu interstitiel; elles ne se trouvent pas dans les cellules épithéliales. (Nous avons là une confirmation de ce fait que la cellule épithéliale n'est pas le lieu des levures.)

Mieux que les observations de San Felice, ce fait montre que, au voisinage d'une tumeur à levure, il peut y avoir prolifération de la cellule épithéliale par une action à distance. Mais on n'a pas le droit d'en conclure que le parasite des tumeurs cancéreuses est une levure. La coccidie du lapin provoque aussi la formation d'adénomes.

Il y a là seulement des faits très intéressants sur le rôle pathogène des levures; il faut savoir gré à San Felice de les avoir étudiés avec soin, parce qu'ils nous montrent que pour expliquer le développement anormal d'une cellule épithéliale et la production de tumeurs cancéreuses, les recherches ne doivent

pas être limitées au seul groupe des Sporozoaires. Peut-être faudra-t-il penser aussi à des bactéries, à des champignons, peut-être même à des levures, parasites qui seraient non pas dans le tissu épithélial lui-même, mais dans le stroma conjonctif des tumeurs, là où l'observation microscopique montre si souvent des processus réactionnels intenses.

Chaque type de tumeur devra être étudié individuellement, et on ne saurait parler d'un *microbe du cancer*.

Peut-être y aura-t-il plus tard des tumeurs à Sporozoaires, peut-être des tumeurs à bactéries, peut-être même des tumeurs à levures. Toutes les hypothèses sont permises, mais jusqu'ici aucune ne nous paraît démontrée.

## EXPLICATION DES PLANCHES

### PLANCHE III

FIG. 1, 2, 3, 4, 5. — Reproduction de quelques figures du travail de Sawtchenko, montrant différentes formes d'inclusions cellulaires considérées par lui comme parasites.

FIG. 6. — Coupe de testicule du cobaye montrant différents stades de la formation du spermatozoïde.

*a.* Spermatocyte avec un idiosome contenant 2 grains centrosomiques.

*b'* multiplication des grains centrosomiques.

*c, b, d'* développement et concentration de la substance chromatique dans l'intérieur d'une vacuole de l'archoplasma.

*e.* l'idiosome arrive au contact du noyau et le coiffe, prolongements archoplasmiques aboutissant à la formation de l'anneau; début de l'énucléation cellulaire.

*f, g.* stades plus avancés de la formation du spermatozoïde.

FIG. 7. — Une cellule de la moelle osseuse chez le lapin, grains centrosomiques multiples, d'après Heidenhain.

FIG. 8. — Une cellule cancéreuse montrant très nettement l'archoplasma coloré en bleu foncé par le carmin d'indigo, dans l'archoplasma des pseudo-parasites qui ne sont que des portions de la sphère.

### PLANCHE IV

FIG. 1. — Une cellule cancéreuse; coloration par le rouge Magenta suivi de picro-indigo carmin après fixation au Flemming.



Dans le protoplasma, une sphère archoplasmique colorée en bleu foncé, à l'intérieur 4 grains centrosomiques en diplocoques.

FIG. 2. — Une sphère archoplasmique plus développée dans la cellule cancéreuse, et contenant une longue chaînette de centrosomes.

FIG. 3. — Dans une cellule cancéreuse, une sphère avec prolongements radiaires contenant des grains centrosomiques de différentes grosseurs.

FIG. 4. — L'archoplasme s'entoure d'une vacuole dans la cellule cancéreuse, et se présente sous forme de 2 pseudo-amibes intra-cellulaires.

FIG. 5, 6, 7. — Différentes formes de vacuolisation totale de l'archoplasma.

FIG. 8. — Dans une cellule cancéreuse, certains grains centrosomiques sont en voie de développement et individualisés dans des vacuoles plus ou moins grosses. Il reste au centre un petit chapelet de grains non différenciés.

FIG. 9 et 10. — Division de l'archoplasma contenant de très nombreux grains centrosomiques.

#### PLANCHE V

FIG. 11. — Une cellule cancéreuse contenant un très grand nombre de centrosomes, début de la vacuolisation protoplasmique : il reste des grains en amas non entourés de vacuoles.

FIG. 12. — Forme du pseudo-parasite en œil de pigeon (von Leyden) comparer avec Planche III, fig. 6 *d d'*. Dans la cellule, des grains centrosomiques au nombre de 6 non différenciés.

FIG. 13, 14, 15, 16, 17. — Différentes formes de pseudo-amibes intra-cellulaires par groupes de 2 ou 4; presque toujours on trouve au centre de la cellule, autour des vacuoles, des grains centrosomiques en amas.

FIG. 18, 19, 20, 21. — Formes compliquées, monstrueuses, de développement et de dégénération de l'archoplasma de la cellule cancéreuse.

---

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ORIGINE DE L'ALEXINE DES SÉRUMS NORMAUX.

PAR LE D<sup>r</sup> O. GENGOU (DE LIÈGE).

---

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

---

Malgré la concordance de la théorie leucocytaire de M. Metchnikoff avec tous les faits de l'immunité naturelle, le rôle des globules blancs dans la défense de l'organisme ne fut pas, sans objection, admis par tous les bactériologistes. Aussi le pouvoir bactéricide que von Fodor, Nuttall, Flügge, etc., trouvèrent au sérum sanguin des animaux normaux, servit-il de base aux adversaires de la théorie cellulaire, à laquelle ils opposèrent la théorie humorale, dont Büchner se fit un des plus ardents défenseurs. L'alexine de Büchner, qui se trouve dans les sérums normaux, était pour eux la clef de tous les phénomènes d'immunité naturelle.

Toutefois, d'autres auteurs allemands émirent des doutes sur l'existence de cette alexine et Baumgarten, par exemple, s'appuyant sur les recherches de Jetter<sup>1</sup>, de Szeleky et Szana<sup>2</sup>, de Walz<sup>3</sup>, prétendit que la diminution du nombre des bactériesensemencées dans un sérum dépendait, non pas d'une substance particulière, comme le soutient Büchner, mais du passage brusque d'un milieu dans un autre, ce qui entraînerait la mort des microbes faibles, les plus résistants seuls parvenant à s'y multiplier. Nous ne voudrions pas nous étendre trop longuement sur cette hypothèse; cependant il y a certains faits qui plaident assurément contre cette manière de voir. C'est ainsi que Denys et Kaisin<sup>4</sup> observèrent que, contrairement à ce que dit Jetter, le nombre

1. Jetter, *Arch. auf d. Geb. d. path. Anat.* Bd. I, 1892.

2. Szeleky et Szana, *Cent. f. Bakter.* Bd. XII, 1892.

3. Walz, *Über die Sogenannte bactericide Eigenschaft des Blutserums*, 1899.

4. Denys et Kaisin, *La Cellule*, 1893.



de germes tués par le sérum est proportionnel à la quantité et à la qualité de ce sérum, et non à la quantité de microbes ensemencés; en outre que des bactéries, provenant de cultures jeunes, par conséquent résistantes, ou de cultures faites dans du sang du même animal, par conséquent accoutumées à ce milieu, ne supportent pas mieux que des cultures vieilles, en somme affaiblies, ou provenant d'autres milieux, c'est-à-dire non accoutumées, le passage dans du sérum frais. De même la fixation de l'alexine sur les microbes ou les globules rouges, si bien démontrée aujourd'hui (Bordet<sup>1</sup>), est totalement en opposition avec l'hypothèse dont il s'agit. D'autres faits encore, tels que la découverte de l'antialexine (Bordet<sup>2</sup>), y trouveraient aussi difficilement une explication quelconque. Finkh<sup>3</sup> est revenu cependant à la charge, en montrant qu'il suffit d'ajouter une trace de sels à du sérum bactéricide, pour lui enlever tout son pouvoir; ce fait ne prouve évidemment rien, car on peut tout aussi bien admettre que ces sels détruisent l'alexine ou empêchent son action.

L'hypothèse de Baumgarten ne rendit donc nullement compte des faits observés par Büchner, etc., et la théorie alexique n'en resta pas moins très en vogue en Allemagne. Cependant l'auteur de la théorie cellulaire maintint ses propositions, signalant d'autre part les faits nombreux où le pouvoir bactéricide des sérums normaux est en contradiction avec l'immunité. Peu à peu, on se mit à rechercher l'origine de ce pouvoir bactéricide du sérum, et les promoteurs initiaux eux-mêmes de la théorie humorale reconnurent, en partie du moins, le bien-fondé de la théorie cellulaire. C'est ainsi que Werigo<sup>4</sup> démontra, en injectant dans le torrent circulatoire des cultures microbiennes, que les oscillations que subit alors le pouvoir bactéricide du sérum, et qui avaient été déjà signalées par Nissen<sup>5</sup>, étaient complètement en rapport avec des variations identiques du nombre des globules blancs dans le sang. Bastin<sup>6</sup>, Everard, Demoor et Massart<sup>7</sup>, Havet<sup>8</sup> firent la même constatation; Bordet obtint

1. Bordet, *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1900.

2. Bordet, *Loc. cit.*

3. Finkh, *Centr. f. Bakter.*, 1900.

4. Werigo, *Ces Annales*, 1891.

5. Nissen, *Zeitschr. f. Hyg.*, 1888.

6. Bastin, *La Cellule*, 1892.

7. Everard, Demoor et Massart, *Ces Annales*, 1893.

8. Havet, *La Cellule*, 1894.

le même résultat en injectant simplement du carmin dans le courant sanguin des animaux.

Les leucocytes paraissaient donc avoir un rôle prépondérant dans le pouvoir bactéricide du sérum, et la démonstration en fut faite en effet. Denys et Havet <sup>1</sup> notamment, ayant obtenu des exsudats riches en globules blancs, y constatèrent un pouvoir bactéricide supérieur à celui des sérums sanguins correspondants; seulement il n'est pas tenu, dans les expériences telles que ces auteurs les ont établies, suffisamment compte d'un facteur très important, à savoir la phagocytose, attendu qu'ils se servent d'exsudats où les leucocytes sont vivants. Peu après, Büchner <sup>2</sup> se servait de cette méthode, et, après avoir tué les leucocytes par le froid suivi d'une brusque élévation de température, obtenait un liquide extrêmement bactéricide et dans lequel la substance germicide, l'alexine, disparaissait, comme dans les sérums sanguins, à 55°. D'autres encore reprirent le sujet; Bail, Schattenfroh, Lowit, Jacob obtinrent des extraits par des méthodes diverses (voir à ce propos la revue de M. Besredka <sup>3</sup>), et qui prêtent fort à la critique, puisque dans tous il y a adjonction de substances étrangères aux leucocytes (Lowit, Bail, Jacob) ou action d'une température élevée (Schattenfroh).

L'origine leucocytaire de l'alexine du sérum était de la sorte admise par la grande majorité des auteurs, quand M. Pfeiffer, se basant sur la transformation granuleuse du vibron cholérique, en dehors de toute action apparente des leucocytes, fit revivre la théorie humorale de Flügge. Ce phénomène servit naturellement de critérium dans un grand nombre de recherches ultérieures sur l'origine du pouvoir bactéricide du sérum. Si la théorie humorale était vraie, le phénomène de Pfeiffer devait s'observer dans les liquides formés dans l'organisme, sans intervention quelconque des globules blancs; aussi M. Metchnikoff <sup>4</sup>, ayant provoqué, par le ralentissement de la circulation, des œdèmes passifs, privés de leucocytes, et y ayant injecté des vibrions cholériques, y chercha-t-il la transformation granuleuse; jamais il ne put l'y observer, ce qui démontrait

1. Denys et Havot, *Idem*, 1894.

2. Buchner, *Cent. f. Bakter.* 1894.

3. Besredka, *Ces Annales*, 1898.

4. Metchnikoff, *Idem*, juin, 1893.



l'absence de toute alexine dans ce milieu. De même, M. Bordet<sup>1</sup>, ayant retiré de semblables ordèmes obtenus chez le lapin, même vacciné contre le choléra, démontra que, *in vitro* comme *in vivo*, le phénomène de Pfeiffer faisait totalement défaut, et que le milieu pullulait de microbes après quelques heures.

La contre-partie restait à faire, et elle le fut. M. Metchnikoff ayant injecté des vibrions sous la peau de cobayes vaccinés contre le choléra, constata l'absence complète du phénomène de Pfeiffer à l'endroit de l'injection, tant que les leucocytes n'y furent pas arrivés, et, quand il se produisit, ce fut toujours à l'intérieur de ces derniers<sup>2</sup>. Ce fait fut observé également par M. Salimbeni<sup>3</sup>, chez les animaux hypervaccinés contre le bacille diphtérique, le streptocoque de Marmorek et le vibron cholérique. Injectés sous la peau de ces animaux, ces microbes ne meurent qu'à l'intérieur des leucocytes, qui eux seuls aussi transforment en boule le vibron du choléra.

En résumé, le phénomène de Pfeiffer, l'arme nouvelle de la théorie humorale, servit de plus en plus à la démonstration de la théorie cellulaire. Seulement, M. Salimbeni insista sur ce point que toujours la mort des bactéries se produisait uniquement dans les leucocytes polynucléaires et jamais dans les leucocytes mononucléaires. Ce fait est absolument conforme à ce qu'avait observé M. Metchnikoff et qu'il avait bien voulu me communiquer oralement : c'est que si les leucocytes mononucléaires peuvent, comme les globules blancs à noyaux multiples, phagocyter les microbes vivants, ils ne peuvent pas comme eux détruire aussi rapidement ces derniers, et ils deviennent en dehors de l'organisme de véritables cultures bactériennes.

C'est là un fait qui mérite grande attention, et qui n'a pas suffisamment été pris en considération par les auteurs qui avaient auparavant recherché le pouvoir bactéricide *in vitro* des exsudats à globules blancs. Du reste, cette distinction ne fut pas faite davantage ultérieurement par ceux qui se sont encore occupés de l'origine leucocytaire de l'alexine des sérums. C'est ainsi que dernièrement, alors que tant de preuves avaient été fournies

1. BORDET, *Idem*, juin 1895.

2. Si, dans le péritoine, on voit, comme M. Metchnikoff l'a observé lui-même, le vibron cholérique se transformer en boule, ce n'est que quand il y a eu phagolyse, et que un certain nombre de leucocytes, morts ou très altérés, ont laissé leur alexine sortir de leur protoplasme.

3. SALIMBENI, *Ces Annales*, 1897.

en faveur de la théorie cellulaire, Moxter <sup>1</sup> s'affirma défenseur de la théorie humorale. Recherchant la production du phénomène de Pfeiffer dans les exsudats leucocytaires, *sans déterminer l'espèce à laquelle il s'adressait*, il ne l'y trouva que faible et inférieur à celui que donne le sérum sanguin. Du reste, le travail de Moxter présente d'autres imperfections qui peuvent avoir eu quelque importance dans les résultats de cet auteur : c'est ainsi que, dans certains cas, il emploie, sans aucune tentative d'extraction de l'alexine, les exsudats tels quels, sans s'occuper de leur richesse comparative en leucocytes, alors qu'il est bien connu que chez le chien, l'exsudat, plus abondant, est aussi plus riche en cellules que chez le lapin, et aussi qu'on observe de grandes variations entre les divers sujets d'une même espèce animale; d'autres fois, il cherche un pouvoir bactéricide intense — et sans succès, — dans l'exsudat privé de ses cellules par la centrifugation, admettant *a priori* que si le leucocyte est l'origine de l'alexine, il la sécrète, lui vivant, ce qui, croyons-nous, n'a pas encore été démontré; enfin, dans une dernière série d'expériences, Moxter constate que les leucocytes, traités par la méthode de Büchner, contiennent de l'alexine : seulement il néglige cette fois d'indiquer le pouvoir bactéricide du sérum des mêmes animaux, ce qui rend impossible la comparaison nécessaire dans ces expériences.

Peu après, von Dungern <sup>2</sup>, concluant à l'absence d'alexine hémolytique dans les exsudats à globules blancs, omettait également de rechercher l'espèce leucocytaire dont il se servait. Enfin, récemment, Bail <sup>3</sup>, reprenant la méthode primitive de l'ensemencement périodique en plaques qu'avait employées Büchner, arrivait aisément à démontrer l'origine leucocytaire de l'alexine chez le chien, tandis qu'il lui était impossible de faire la même démonstration chez le lapin; lui non plus, du reste, ne se soucie pas de savoir s'ils'agit de leucocytes à un ou à plusieurs noyaux.

Il nous a paru intéressant de reprendre cette question en y introduisant ce facteur, si peu observé par la plupart des auteurs précédents, c'est-à-dire l'importance que peut avoir la nature

1. Moxter, *Deutsche med. Woch.*, 1899.

2. V. Dungern, *Münch. medic. Wochenschr.*, 1899.

3. Bail, *Central. f. Bacter.*, 1900.



de l'espèce leucocytaire en jeu; nous prions M. Metchnikoff de recevoir ici l'expression de notre vive reconnaissance pour l'intérêt avec lequel il a suivi ce travail, et pour les multiples et précieux conseils qu'il a bien voulu nous donner.

Dans la première partie, nous nous sommes uniquement occupé de rechercher si réellement les leucocytes contiennent une substance analogue à l'alexine du sérum normal; dans la seconde, nous chercherons à savoir s'il faut admettre, comme le pense M. Metchnikoff, que l'alexine leucocytaire ne diffuse du globule blanc que quand ce dernier est mort ou très avarié, ou si, comme le croit M. Büchner, l'alexine constitue une véritable sécrétion vitale du leucocyte. C'est pourquoi nous n'avons pas parlé, dans l'historique qui précède, des recherches qui ont eu pour but d'éclaircir ce dernier point, nous réservant de le faire dans la suite.

## PREMIÈRE PARTIE

### Recherche de l'alexine dans les exsudats leucocytaires.

Nous nous sommes servi, pour obtenir des leucocytes en abondance, chez le chien comme chez le lapin, de la gluten-caséine, employée d'abord par Buchner<sup>1</sup>. En injectant dans les cavités pleurales de ces animaux, 4 c. c. d'une solution alcaline de gluten-caséine, on obtient un exsudat, où les leucocytes abondent, et pouvant varier chez le lapin, de 2 à 4 c. c. et chez le chien de 10 à 13 c. c. pour chaque plèvre. Mais l'espèce leucocytaire varie, suivant que l'on retire l'exsudat 24 heures après l'injection intra-pleurale, ou seulement après 2 ou 3 jours; extrêmement riche, dans le premier cas, en leucocytes polynucléaires, l'exsudat, dans le second, contient une forte majorité de mononucléaires.

Cette substance nous a permis, chez le chien comme chez le lapin, d'obtenir de grandes quantités de leucocytes presque

1. Voici la façon suivant laquelle il nous a paru préférable de préparer le liquide à injecter dans les plèvres du lapin. La gluten-caséine du commerce est broyée finement, puis ajoutée à la dose de 1 pour 10 à une solution à 1/2 0/0 de potasse, chauffée à 100°. Après une demi-heure, le mélange est porté pendant 2 à 3 heures au bain-marie à 55°. On obtient ainsi un liquide jaunâtre, extrêmement louche, qui contient une grande quantité de la gluten-caséine renfermée dans le produit commercial. Le liquide est stérilisé deux jours de suite pendant un quart d'heure à 100°, puis sert à l'injection.

exclusivement polynucléaires ; c'est elle aussi qui nous a servi chez le chien, pour collecter des leucocytes à un seul noyau ; chez le lapin, nous basant sur la démonstration qu'a faite M. Metchnikoff <sup>1</sup> de la phagocytose des globules rouges de lapin par les macrophages mononucléés du cobaye, nous avons injecté, dans la cavité pleurale, des globules rouges lavés de cobaye ; après 2 jours, on retire de la plèvre un liquide extrêmement visqueux contenant, à côté d'une certaine quantité de fibrine, une forte quantité de leucocytes, qui sont, pour ainsi dire, tous de grandes cellules à un seul noyau.

L'exsudat aseptique, une fois retiré de la plèvre, est centrifugé ; les leucocytes, réduits de la sorte à leur véritable volume, sont lavés deux fois à l'eau physiologique et, après dernière centrifugation, additionnés de leur volume de bouillon. Cette émulsion est congelée, d'après la méthode de Buchner, en la plongeant dans de la glace additionnée de sel marin. Après deux ou trois heures, l'exsudat est rapidement transporté de ce mélange à une température de 37° où, ainsi que Buchner l'a montré, la mise en liberté de l'alexine leucocytaire est grandement facilitée. L'exsudat est ainsi laissé 24 heures à l'étuve, puis soumis à l'expérimentation, comparativement avec un volume identique de sérum, de bouillon, etc.

Pour constater le pouvoir bactéricide des extraits leucocytaires ainsi obtenus, nous avons utilisé la méthode des plaques, faites à des intervalles de plus en plus éloignés de l'ensemencement des milieux en expérience. Nous avons employé, pour le chien et le lapin, le vibron cholérique, le *bacillus typhosus*, le *bacterium coli* et la bactéridie charbonneuse.

# I

## EXUDATS RETIRÉS DES CAVITÉS PLEURALES 24 HEURES APRÈS L'INJECTION DE GLUTEN-CASÉINE

A. *Lapin*. — 1. Exsudat de la plèvre droite : 83 0/0 de leucocytes polynucléaires.

Exsudat de la plèvre gauche : 95 0/0 de leucocytes polynucléaires.

1. Metchnikoff, *Ann. Pasteur*, 1899.



Microbe ensemencé : *Bacterium coli*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocytaire. (Pl. g.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)	Extrait leucocytaire. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. dr.)
I. (Immédiatement après l'ensemencement.)	3,250	4,023	10,135	3,800	7,813	4,025	3,034
II. (3 heures après.)	3,029	23	8,432	3,242	802	4,347	510
III. (24 heures après.)	∞	41	∞	8	2	0	49
IV. (48 heures après.)	∞	0	∞	8	0	0	0

2. Exsudat de la plèvre droite : presque uniquement des leucocytes polynucléés ; il en est de même de la plèvre gauche. Microbe ensemencé : *Bacillus typhosus*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)	Extrait leucocyt. (Pl. g.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)
I.	4,162	4,549	6,398	7,268	4,376	43,840	45,600
II.	2,080	1,013	2,776	3,770	4,777	5,466	44,200
III.	∞	0	∞	0	∞	0	∞
IV.	∞	0	∞	0	∞	0	∞

3. Exsudat de chaque cavité pleurale : presque exclusivement des leucocytes polynucléaires. Microbe ensemencé : *Bactériidie charbonneuse*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. dr.)	Extrait leucocyt. (Pl. g.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)
I.	630	544	537	432	578	629	490
II.	634	348	438	3	31	41	9
III.	∞	5	∞	4	2	3	0
IV.	∞	3	∞	0	2	0	0

4. Exsudat de la plèvre droite : 85 0/0 de leucocytes polynucléaires.

Exsudat de la plèvre gauche : 89 0/0 de leucocytes polynucléaires.

Microbe ensemencé : *Vibron cholérique*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. dr.)	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. dr.)
I.	4,521	4,830	1,274	1,642	1,402	1,910	1,763
II.	1,603	0	1,108	0	1,442	0	1,508
III.	∞	0	∞	0	∞	0	∞
IV.	∞	0	∞	0	∞	0	∞

5. Exsudat renfermant 79 0/0 de leucocytes polynucléaires.  
Microbe ensemencé : *Vibron cholérique*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	12,008	11,964	6,480	10,144	8,576
II.	12,422	0	7,020	800	1,872
III.	∞	0	∞	55	5,742
IV.	∞	0	∞	0	∞

6. Exsudat contenant 98 0/0 de leucocytes polynucléaires.  
Microbe ensemencé : *Bacterium coli*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	3,657	14,160	1,520	49,160	6,118
II.	10,160	10	5,895	8	54
III.	∞	0	∞	0	2
IV.	∞	0	∞	0	0



Il résulte de ces tableaux que, chez le lapin, l'extrait leucocytaire, obtenu comme nous l'avons indiqué plus haut, est manifestement bactéricide, lorsqu'il s'agit de globules blancs à noyaux multiples.

B. *Chien*. — Toujours, chez le chien, la gluten-caséine nous a donné, après 24 heures, des exsudats formés, pour ainsi dire, exclusivement de leucocytes polynucléaires.

1. Microbe expérimenté : *Vibrien cholérique*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	8,652	5,760	5,460	14,600	3,312
II.	3,730	25	4,785	520	52
III.	17,280	0	∞	0	0
IV.	∞	0	∞	0	0

2. Microbe expérimenté : *Bacillus typhosus*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de leucocyt.
I.	4,816	6,708	4,376	2,316	4,304
II.	3,212	52	3,300	200	2,440
III.	∞	0	∞	0	0
IV.	∞	0	∞	0	0

3. Microbe expérimenté : *Bacterium coli*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de leucocyt.
I.	2,970	2,860	5,376	10,260	8,360
II.	4,320	159	4,906	2,394	7,760
III.	∞	∞	∞	∞	∞
IV.	∞	∞	∞	∞	∞

4. Microbe ensemencé : *Bacterium coli*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	4,515	5,590	7,740	2,584	2,332
II.	13,103	864	12,672	448	13,430
III.	∞	21,440	∞	∞	∞
IV.	∞	∞	∞	∞	∞

## 5. Microbe ensemencé : Bactéridie charbonneuse.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	152	125	154	560	159
II.	118	115	145	184	95
III.	26,100	∞	∞	7	∞
IV.	∞	∞	∞	3	∞

En résumé, chaque fois que, chez le chien, le sérum du sang est bactéricide, il en est de même de l'extrait obtenu des leucocytes polynucléaires; c'est le cas pour le bacillus typhosus et le vibrion cholérique. Au contraire, le sérum du chien s'est montré peu bactéricide pour le coli-bacille et la bactéridie charbonneuse; mais si, de même, le coli-bacille est assez résistant pour se multiplier malgré la puissance bactéricide de l'extrait leucocytaire, il n'en est plus de même de la bactéridie charbonneuse. Ce fait a été signalé bien des fois déjà, et c'est, de tous les résultats précédents, le seul qui puisse faire supposer que les leucocytes polynucléaires contiennent plus de substance bactéricide que le sérum sanguin, et qui permette de penser qu'ils en soient l'origine.

Mais dans les expériences ainsi établies, il n'est pas tenu suffisamment compte de ce fait que, pour obtenir l'extrait leucocy-

taire, on mélange les globules blancs à un volume égal de bouillon, par conséquent à un milieu extrêmement favorable au développement microbien, et que l'on n'a pas ajouté au sérum. Pour juger avec plus de raison si un volume donné de sérum contient plus ou moins de substance bactéricide qu'un même volume de leucocytes polynucléaires; il faut mettre ces deux volumes dans des conditions identiques, c'est-à-dire ajouter à un volume de sérum un volume égal de bouillon, comme nous l'avons fait pour obtenir l'extrait leucocytaire. C'est pourquoi nous avons comparé, dans l'expérience suivante, ce qui se passe quand on ensemence, d'une part du sérum normal, et de l'autre un mélange à parties égales de sérum et de bouillon.

## LAPIN

CHARBON			CHOLÉRA			COLI			TYPHUS		
Pl.	Sérum.	Sér.-bouill.	Pl.	Sérum.	Sér.-bouill.	Pl.	Sérum.	Sér.-bouill.	Pl.	Sérum.	Sér.-bouill.
I.	2,030	2,317	I.	1,918	1,690	I.	2,970	2,596	I.	2,417	2,630
II.	1,520	2,430	II.	631	1,124	II.	1,624	2,908	II.	419	1,520
III.	0	∞	III.	0	∞	III.	0	∞	III.	0	∞
IV.	0	∞	IV.	0	∞	IV.	0	∞	IV.	0	∞

## CHIEN

CHOLÉRA		
Plaques.	Sérum.	Sérum-bouillon.
I.	1,521	1,609
II.	1,282	1,627
III.	319	∞
IV.	0	∞

Cette expérience montre que des microbes peuvent parfaitement se multiplier dans un mélange à parties égales de sérum



normal et de bouillon, alors que nous les avons vus mourir dans un mélange exsudat-bouillon. Un volume donné de leucocytes contient donc plus de substance bactéricide que le même volume de sérum neuf.

Toutefois, il reste à démontrer qu'il s'agit bien, dans les deux cas, d'alexine, c'est-à-dire d'une substance bactéricide détruite à 55°; c'est ce que montre le tableau suivant, où l'on peut voir le pouvoir microbicide des extraits leucocytaires, préparés suivant la méthode indiquée plus haut, disparaître à cette température, de même que celui du sérum, ainsi que Nuttall l'a autrefois établi.

## LAPIN

Plaques.	CHOLÉRA		CHOLÉRA		CHARBON	
	Extrait non chauff.	Extrait chauffé.	Extrait non chauff.	Extrait chauffé.	Extrait non chauff.	Extrait chauffé.
I.	40,144	18,800	15,680	5,670	3,208	4,024
II.	800	13,184	8,120	5,540	3,190	3,725
III.	55	∞	2,720	16,800	0	∞
IV.	0	∞	0	∞	0	∞

Il résulte de tout cela que les leucocytes polynucléaires, obtenus aseptiquement dans la cavité pleurale du chien et du lapin, contiennent en plus grande quantité de l'alexine, semblable à celle du sérum, et qu'ils peuvent être considérés comme la source du pouvoir bactéricide du sérum normal.

## II

EXSUDATS RETIRÉS 2 OU 3 JOURS APRÈS L'INJECTION INTRAPLEURALE DE GLUTEN-CASÉINE.

A. *Chien*. — Voyons ce qui se passe si on utilise, au lieu de

leucocytes polynucléaires, des globules blancs à un seul noyau. Pour obtenir chez le chien une certaine quantité de ces derniers, nous avons, ainsi qu'il a été dit plus haut, encore eu recours à l'injection, dans la cavité pleurale, d'une solution alcaline de gluten-caséine à 10 0/0; 3 jours après on trouve 3 à 4 c. c. de pus épais, en partie liquide, en partie fibrineux, où on observe au microscope une grande quantité de leucocytes, dont 75 0/0 environ sont des cellules mononucléées, le reste étant constitué par des globules blancs à noyaux multiples. Ce pus, dans les expériences suivantes, a été également traité par la méthode de Büchner.

#### 1. Microbe ensemencé : *Bacterium coli*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	2,331	6,048	4,439	2,394	4,098
II.	3,022	4,323	4,812	2,845	4,250
III.	∞	150,000 environ.	∞	∞	∞
IV.	∞	∞	∞	∞	∞

#### 2. Microbe ensemencé : *Vibrion cholérique*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	5,040	3,128	4,905	3,780	4,644
II.	6,132	2	3,322	3,252	4,912
III.	∞	0	∞	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

## 3. Microbe ensemencé : Bactéridie charbonneuse.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	660	540	849	720	872
II.	422	420	812	960	844
III.	∞	∞	∞	∞	∞
IV.	∞	∞	∞	∞	∞

4. Microbe ensemencé : *Bacillus typhosus*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	38	67	72	42	59
II.	44	1	41	4	67
III.	∞	0	∞	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

Ces expériences en somme montrent que, chez le chien, les leucocytes mononucléés fournissent un extrait privé totalement ou tout au moins très pauvre en alexine, alors que nous avons vu l'extrait des leucocytes à noyaux multiples être plus bactéricide, pour 3 espèces bactériennes différentes, que le sérum correspondant.

*B. Lapin.* — Nous nous sommes ensuite occupé des extraits obtenus par la même méthode chez le lapin, où nous avons réussi à collecter, dans les cavités pleurales, des leucocytes mononucléaires, par l'injection de globules rouges de cobaye, à la dose de 2 c. c. par plevre.



1. Microbe ensemené : *Vibrio cholérique*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	3040	3,108	570	3,840
II.	3,208	32	576	5,760
III.	∞	2	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞

 2. Microbe ensemené : *Bacterium coli*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	1,090	942	720	550
II.	448	0	109	228
III.	∞	0	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞

 3. Microbe ensemené : *Bacterium coli*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	982	1,020	719	908
II.	1,464	4	756	810
III.	∞	91	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞

## 4. Microbe enseimencé : Bactéridie charbonneuse.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	432	324	372	220
II.	426	2	312	1,022
III.	3,744	0	3,078	$\infty$
IV.	$\infty$	2	$\infty$	$\infty$

5. Microbe enseimencé : *Bacillus typhosus*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	1,656	704	1,098	1,815
II.	1,352	445	858	1,820
III.	$\infty$	4	$\infty$	$\infty$
IV.	$\infty$	0	$\infty$	$\infty$

En conséquence, chaque fois, chez le lapin comme chez le chien, l'extrait obtenu par la congélation d'un exsudat riche en leucocytes mononucléaires s'est montré pauvre en alexine.

Ces résultats démontrent que l'alexine, chez le chien et chez le lapin, se trouve en plus grande quantité dans les leucocytes polynucléaires que dans le sérum normal du sang, tandis que les globules blancs à un seul noyau ne doivent en contenir que de faibles proportions. On peut logiquement en déduire que les premiers, les leucocytes à noyaux multiples, sont la source de l'alexine que l'on observe dans le sérum normal.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CAUSALE DES MODIFICATIONS D'ÉTAT DES COLLOÏDES

---

## SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

DE LA

# MICELLE ALBUMINOÏDE

PAR LE D<sup>r</sup> SWIGEL POSTERNAK

---

Introduction. — Les colloïdes et les méthodes de détermination du poids moléculaire. Définition des colloïdes. Problème à résoudre.

Chapitre I<sup>er</sup>. — Plan et méthode.

Chapitre II. — Sur les albuminoïdes de réserve de *Picea excelsa* en solution acide. Discussion des résultats numériques, ions solubilisateurs, les molécules non dissociées agents précipitants.

Chapitre III. — Preuves tirées des phénomènes d'addition et des effets de dilution. Substitution d'un électrolyte à dissociation très forte par un autre qui dissocie faiblement.

Chapitre IV. — Rôle de la mobilité des ions. Influence de la température. Réaction des albumoses avec l'acide nitrique.

Chapitre V. — Affinité de la micelle albuminoïde, et son rôle dans les phénomènes de précipitation. Mécanisme de la précipitation d'après Virchow, Nasse, Hofmeister. Relation entre l'équivalent endosmotique et les concentrations précipitantes.

Chapitre VI. — Généralisation des règles tirées de l'étude des albuminoïdes de *Picea excelsa*. Sur les albuminoïdes de *Cucurbita Pepo*, *Lupinus albus* et *luteus*, et du blanc d'œuf en solution acide. Sur le quotient  $\frac{b}{a}$  et la modification de l'énergie de l'affinité sous l'influence de la température.

Chapitre VII. — L'affinité micellaire est d'ordre adhésif. Grosseur et élasticité micellaire. Agents modifiant la grosseur de la micelle albuminoïde.

Chapitre VIII. — Albuminoïdes en solution alcaline au point de vue de leurs rapports aux sels. Enantiomorphisme tabellaire.

Chapitre IX. — Pouvoir électrisant des ions et des électrolytes. Pouvoir électrisant relatif des ions vis-à-vis d'une micelle conductrice et non conductrice. Le rapport  $\frac{b}{a}$  et la modification de la mobilité des ions sous l'influence de la température. Résumé.

Chapitre X. — Mécanisme de la solubilisation des colloïdes. Méthodes de préparation des solutions colloïdes. Rapport entre le pouvoir électrisant et l'énergie solubilisante des électrolytes vis-à-vis des colloïdes à micelles con-



ductrices et non conductrices. Démonstration directe de la variation de la grosseur micellaire. Étude sur le blanc d'œuf. Albuminase.

Chapitre XI. — Mécanisme de la précipitation des colloïdes. Travaux de MM. Wyruboff et Verneuil sur les oxydes condensés des terres rares. Affinité élective des micelles colloïdes. Précipitation des albuminoïdes par la peptone de Witte, par la gomme arabique et par d'autres polysaccharides.

Chapitre XII. — Sur les phénomènes de coagulation.

Chapitre XIII. — La théorie d'histone de M. Kossel. Remarques sur la chimie cellulaire.

Conclusions.

## INTRODUCTION

LES COLLOÏDES ET LES MÉTHODES DE DÉTERMINATION DU POIDS MOLÉCULAIRE. — DÉFINITION DES COLLOÏDES. — PROBLÈME À RÉSOUDRE.

La faculté de changer d'état sous l'influence de causes relativement peu importantes n'appartient pas, comme on sait, en propre aux matières albuminoïdes, mais se retrouve aussi chez la plupart des substances de constitution chimique fort différente que l'on range depuis Graham dans le groupe des *colloïdes*. Cette faculté relève, sans aucun doute, de la même cause que les autres caractères qui donnent aux colloïdes leur physionomie spéciale, notamment la lenteur d'hydrodiffusion, l'impossibilité de passer à travers les membranes, la tendance faible, sinon nulle, à la cristallisation. Aussi nous semble-t-il indiqué, avant de commencer l'exposé de nos recherches sur le mécanisme des modifications d'état des albuminoïdes, de soumettre à une discussion rapide les idées en cours sur l'état colloïde en général. Les questions à étudier dans ce mémoire s'en dégageront avec plus de précision et de netteté.

Déjà Graham s'était demandé s'il ne fallait pas chercher la raison d'être de l'état colloïde dans la *nature composée* des molécules, et la cause des propriétés qui caractérisent les colloïdes dans la *grosseur* des particules en solution. Les travaux ultérieurs des auteurs qui ont appliqué à l'étude de ces substances les méthodes physico-chimiques, telles que la cryoscopie, l'ébullioscopie, la mensuration de la pression osmotique, semblent confirmer cette manière de voir. Cependant, sous l'influence du

malentendu qui s'est glissé petit à petit dans l'appréciation des résultats auxquels amènent ces méthodes, l'hypothèse initiale de Graham s'est métamorphosée en ce sens que c'est dans le *haut poids moléculaire* que l'on a placé l'explication des phénomènes observés dans les solutions des colloïdes.

C'est ainsi que nous lisons dans l'excellent livre de M. Nernst : « La grande lenteur de diffusion (des colloïdes) plaide d'une part en faveur d'une force motrice très faible, c'est-à-dire d'une pression osmotique peu notable, d'autre part en faveur d'une grande résistance au frottement que les molécules rencontrent au cours de leur mouvement dans l'eau ; les deux choses peuvent être expliquées par cette supposition que *les colloïdes possèdent un haut poids moléculaire*<sup>1</sup>. »

Certes, cette opinion n'a rien d'excessif tant qu'on l'applique aux substances telles que les albuminoïdes, dont la constitution chimique est très compliquée ; mais lorsqu'on l'étend aux corps d'une composition aussi simple que les hydrates et les sulfures de métaux, qui entrent facilement dans des combinaisons chimiques d'un poids moléculaire tout à fait normal, ne semble-t-il pas qu'on dépasse de beaucoup la signification qu'ont donnée au terme molécule les savants qui l'avaient introduit dans la science, signification qui y est consacrée par l'usage ?

L'auteur précité se base surtout, en parlant du haut poids moléculaire des colloïdes, sur les résultats des mensurations cryoscopiques et de la pression osmotique des solutions colloïdes, qui ont amené à des nombres assez hauts. En effet, pour prendre quelques exemples, M. Pfeffer a calculé pour la dextrine un poids moléculaire 1,080, pour la cong lutine 9,500 ; MM. Brown et Morris, pour l'inuline 2,200, l'amidon 25,000, pour la malto-dextrine 965 ; MM. Gladstone et Hibbert, pour l'hydrate de cuivre 6,000 ; M. Sabaneieff, pour la silice 49,000, le glycogène 1,625 ; MM. Sabaneieff et Alexandroff pour l'albumine d'œuf 14,000, etc. Mais en admettant même que ces nombres soient exacts et n'aient pas été influencés par les impuretés dont il est si difficile de débarrasser les colloïdes, est-on en droit d'en tirer une conclusion sur le poids moléculaire de ces matières ?

Je crois que non. De l'ensemble des faits connus jusqu'ici, il me paraît résulter clairement que les méthodes physico-chimiques

1. M. Nernst, *Theoretische Chemie*, 2 Auflage, Stuttgart, 1898, p. 384.

indiquent moins le poids moléculaire, c'est-à-dire le minimum de substance possédant encore toutes ses propriétés chimiques, que la quantité qui agit comme *unité* sur la modification de la densité de la vapeur, sur l'abaissement de la température de congélation, sur l'élévation de la température d'ébullition, ou l'augmentation de la pression osmotique.

Un minimum, de par sa nature, ne peut être qu'un dans chaque cas particulier. Or, pour un certain nombre de corps, on arrive par la même méthode à des valeurs différentes suivant les conditions dans lesquelles ces corps étaient placés. L'acide acétique en solution éthérée, par exemple, abaisse la température de congélation deux fois moins que le même acide dissous dans l'eau, ce qui amène dans le premier cas à la formule  $2C^2H^4O^2$ , dans le second à  $C^2H^4O^2$ . La densité des vapeurs du soufre à la température de 500 degrés environ est de 6,6 à peu près (Dumas, Mitscherlich), ce qui correspond à une valeur de l'unité active égale à  $S^6$  : au-dessus de 800° la densité n'est plus que 2,2 par rapport à l'air. L'unité active est donc dans ces conditions  $S^2$ . En solution dans le benzène, le soufre est à l'état de particules  $S^6$ , comme l'ont montré, à l'aide de la méthode de Raoult, MM. Paterno et Nasini; à l'état de particules  $S^8$  en solution dans le sulfure de carbone et le benzène, d'après les recherches plus récentes de MM. Aronstein et Meihuizen; à l'état de particules  $S^2$  en solution dans  $S^2Cl^2$  suivant MM. Orndorff et Terass<sup>1</sup>. La vapeur du chlorure d'aluminium, d'après les recherches de MM. Friedel et Crafts, possède à la température de 218 à 433 degrés une densité 9,20; elle est donc constituée par des particules  $2 AlCl^3$  : à une température supérieure à 800 degrés, comme il résulte des travaux de MM. Nilson et Petterson, ces particules subissent une dépolymérisation et les molécules  $AlCl^3$  prennent naissance.

Dans ces exemples, dont on pourrait facilement allonger la liste, les vrais minima sont  $C^2H^4O^2$ ,  $S^2$ ,  $AlCl^3$ ; mais alors les valeurs doubles, triples et quadruples ne peuvent plus figurer comme poids moléculaires, à moins de vouloir admettre que les corps sus-indiqués puissent changer leur constitution chimique sous l'influence des conditions extérieures, ce qui serait en contradiction avec toutes les réactions de ces corps, qui restent les

1. *American Chem. Journal*, t. XVIII, p. 3, 1896.



mêmes, et ce qui serait incompréhensible pour une substance aussi simple que le soufre.

L'étude des propriétés physiques des corps solides a imposé depuis longtemps cette idée qu'ils sont constitués par des agglomérations de molécules assez considérables, toutefois beaucoup au-dessous de la portée du microscope, que nous désignerons avec M. Nageli sous le nom de *micelles*. De la structure intime de la micelle, qui peut être définie comme le minimum de substance possédant toutes les propriétés *physiques* de cette dernière, nous ne savons que trop peu ; mais il n'y a pas de doute possible que des molécules absolument identiques peuvent donner naissance à des micelles avec des propriétés physiques fort différentes : les phénomènes d'allotropie et de polymorphie le prouvent surabondamment.

Lorsqu'on met un corps solide en contact avec un dissolvant quelconque, ou lorsqu'on le soumet à une haute température, il commence à se désagréger progressivement jusqu'à ce qu'un équilibre soit établi entre l'adhésion des molécules entre elles dans la micelle et leur affinité pour les molécules du dissolvant dans le premier cas, ou l'énergie dissociante de la chaleur dans le second.

Pour l'acide acétique dissous dans l'éther, cet équilibre est atteint au moment où la micelle s'est divisée en particules composées de deux molécules dont la soudure semble être plus forte que l'union entre les paires dans l'unité physique. L'eau, qui possède une action dissociante plus énergique que l'éther, a facilement raison aussi de l'adhésion de deux molécules dans les particules doubles.

La désagrégation des micelles se faisant en général très rapidement, nous ne pouvons constater le plus fréquemment que l'état final de la dissociation. Il y a pourtant des cas où il nous est donné de la suivre pas à pas à partir d'un moment donné.

A la température d'ébullition du soufre, qui est à 440°, la dissociation des micelles arrive vite à la formation des particules composées de six atomes de ce métalloïde : à partir de 700° et jusqu'à 1080° la densité de la vapeur diminue *graduellement*, ce qui correspond à la dissociation progressive des particules S<sup>6</sup> en des particules plus petites. Le cas de la dioxycétone décrit tout

récemment par M. Bertrand, présente un autre exemple de cette dissociation sous les yeux, pour ainsi dire, de l'observateur. Comme il donne en même temps une illustration quasi directe du rapport entre les propriétés physiques d'un corps et la structure intime de ses micelles, nous le conterons en détail.

Une solution aqueuse de dioxyacétone, évaporée à la température ordinaire dans le vide, cristallise en petits prismes plus ou moins nets et brillants. Les cristaux ainsi obtenus sont sensiblement insolubles à la température ordinaire dans l'alcool absolu, l'éther et l'acétone. La même solution aqueuse, évaporée à la température d'ébullition, ou le sirop obtenu par fusion des cristaux, n'a aucune tendance à la cristallisation et se dissout facilement dans ces liquides. Or, l'étude comparée de la dioxyacétone cristallisée et amorphe ou surfondue, par la méthode de Raoult, a montré que la première modification, lorsqu'on la dissout dans l'eau froide, est à l'état de particules  $2C^3H^6O^3$ , la seconde à l'état de particules deux fois plus petites, et qu'en chauffant graduellement la première solution on assiste à la désagrégation progressive des particules doubles.

Il serait assurément étrange de conclure de ces faits que les cristaux du sucre dont il s'agit posséderaient un poids moléculaire 180 égal à  $2C^3H^6O^3$ , tandis que le sucre amorphe aurait un poids moléculaire deux fois moins grand. Dans les deux cas la formule et le poids moléculaire restent nécessairement les mêmes. Le mode d'agrégation n'est pas non plus représenté par les deux symboles  $2C^3H^6O^3$  et  $C^3H^6O^3$ , puisque les micelles qui, d'après la définition, sont les unités d'agrégation de la matière à l'état solide, doivent être constituées dans les deux cas par des quantités considérables de molécules. La seule déduction logique et conforme aux faits est la suivante : les micelles cristallines de la dioxyacétone possèdent un *détail de construction* qui manque chez les micelles amorphes de ce sucre : notamment la soudure entre les deux molécules de chaque paire est assez forte pour ne pas être détruite par l'eau froide, sinon avec lenteur. Et puis encore, ce n'est que là où les conditions extérieures n'empêchent pas la formation de ces paires, dont a besoin évidemment l'architecture plus complexe de la micelle cristalline, que les cristaux de la dioxyacétone apparaissent avec toutes leurs propriétés physiques (forme cristalline, solubilité, etc.).

Jusqu'ici nous nous sommes occupés des cas où la dissociation de la micelle n'allait pas jusqu'aux molécules. On connaît aussi des faits où la désagrégation dépasse le terme moléculaire. Les méthodes physico-chimiques, appliquées aux solutions des substances minérales ou des sels organiques, ont amené à des résultats très particuliers, difficiles à comprendre si l'on se tient obstinément à croire que ces méthodes indiquent le poids moléculaire. On a obtenu des nombres qui se rapprochent des deux tiers ou de la moitié du poids qu'exigeraient les formules  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , etc., les plus simples, cependant, qu'on puisse imaginer. Ce sont les résultats auxquels sont arrivés d'une façon concordante M. de Vries <sup>1</sup>, M. Pfeffer <sup>2</sup>, par les méthodes osmotiques, M. Raoult <sup>3</sup>, M. Landsberger <sup>4</sup> et beaucoup d'autres par l'ébullioscopie et la cryoscopie. Cette particularité s'explique facilement, comme l'a montré M. Arrhénius, si l'on admet que les molécules salines subissent dans l'eau une dissociation, dite électrolytique, et que les particules qui en résultent, les ions, produisent le même effet sur l'élévation de la température d'ébullition qu'une molécule tout entière ou un agrégat des molécules.

On voit donc que ce n'est que quand la dissociation de la micelle va jusqu'aux molécules — coïncidence très fréquente chez les cristalloïdes organiques, d'où la confusion qui règne dans cette question, et assez rare lorsqu'on prend l'ensemble des matières que nous rencontrons dans la nature — que les méthodes physico-chimiques peuvent servir pour la détermination du poids moléculaire. Dans tous les autres cas, elles n'indiquent que la limite de la désagrégation de la matière, le poids des particules qui ont pris naissance sous l'influence dissociante de l'eau, des autres dissolvants ou de la chaleur.

\*  
\* \*

La question d'efficacité des méthodes physico-chimiques une fois mise au point, il devient évident que l'on commet une inexactitude lorsqu'en s'appuyant sur les résultats des études

1. *Zeitschrift f. physik. Chemie*, t. III, p. 103, 1889.

2. *Pflanzenphysiologie*, t. I, Leipzig, 1897, p. 128.

3. *Annales de chimie et de physique*, [8] 28 p. 133, 1883; [6] 2 pp. 66, 99, 115, 1884; [6] 4 p. 401, 1885.

4. *Ber. d. d. Chem. Gesellschaft*, t. 31, p. 458, (1898.)



cryoscopiques, on affirme que les colloïdes sont caractérisés par leur poids moléculaire très haut. Il y a là une autre chose, à coup sûr non moins intéressante, et qu'il s'agit maintenant de bien saisir. Les exemples les plus simples sont souvent les meilleurs. Voici donc une solution aqueuse d'un cristalloïde, du chlorure d'aluminium, par exemple, dont le poids moléculaire correspond, comme nous l'avons vu, à la formule  $\text{AlCl}_3$ . Nous y ajoutons de l'ammoniaque, et observons la formation d'un précipité ayant la composition de l'hydrate d'aluminium, et pouvant être dissous dans l'eau à l'aide d'un artifice très simple que Graham nous a enseigné. Comme le corps en solution possède toutes les propriétés des colloïdes, nous assistons, évidemment, à la genèse d'un colloïde aux dépens d'un cristalloïde. Que s'est-il donc passé? L'apparition de l'hydrate sous l'influence de l'ammoniaque suppose une réaction chimique entre ce dernier corps et le chlorure d'aluminium. Le chimiste représentera le processus par l'équation



qui signifie qu'une molécule de chlorure d'aluminium a donné naissance à trois molécules de chlorure d'ammonium et à *une* molécule d'hydrate d'aluminium.

Or, cette molécule d'hydrate a cessé d'agir, au moment même de sa production, comme unité sur la modification des constantes physiques de l'eau et c'est justement le point de départ de toutes les autres propriétés colloïdes de la solution. On est en présence ici d'un phénomène complètement opposé à ce que nous avons observé dans le cas des cristalloïdes cités plus haut. Là, la micelle au contact de l'eau donnait naissance à une quantité notable d'unités actives, parce que cette micelle subissait une dissociation plus ou moins complète sous l'influence du dissolvant. Ici, les molécules d'hydrate, leur individualité chimique une fois récupérée, perdent leur faculté d'agir sur la température de congélation, la pression osmotique, etc. Il est évident que la seule cause à incriminer est la formation des agrégats moléculaires. Et comme dans le cas des cristalloïdes la dissociation de la micelle a lieu parce que l'affinité des molécules pour l'eau est plus grande qu'entre elles-mêmes, il est permis, nous semble-t-il, de conclure que, dans le cas de l'hydrate

d'aluminium, les molécules possèdent pour leurs semblables une attraction plus énergique que pour l'eau.

Le même raisonnement peut être appliqué aux hydrates des autres métaux, aux sulfures et à tous les colloïdes dont la constitution chimique nous est connue. Ce n'est que par analogie que nous sommes obligés de l'étendre aux colloïdes d'origine vitale, les albuminoïdes, les hydrates de carbone, etc., ce qui est, d'ailleurs, pleinement justifié, vu l'existence des produits de décomposition de ces corps, tels que les albumoses, les peptones et les dextrines, qui possèdent encore toutes les propriétés chimiques et un état d'agglomération beaucoup moins considérable que les substances mères dont ils dérivent.



Nous arrivons donc à cette définition générale des colloïdes, courte et précise, qui a au moins le mérite de ne pas donner comme caractères fondamentaux des propriétés plus ou moins secondaires. *Les colloïdes sont des corps dont les unités physiques, les micelles, ne se désagrègent pas dans l'eau.* C'est là leur caractère essentiel qui les fait classer dans un groupe à part, et non l'aspect extérieur qui peut être très régulier, comme dans les cristaux d'hémoglobine, ni le poids moléculaire qui peut être assez petit, comme chez l'hydrate d'aluminium.

Cette définition fait entrer dans le groupe des colloïdes *tous les corps insolubles dans l'eau sans exception*, et depuis qu'on a obtenu des solutions colloïdes des métaux comme le platine, l'or, l'argent, etc., on conviendra de la légitimité de cette généralisation.

Elle fait écarter de ce groupe les solutions saturées et sur-saturées des cristalloïdes, qui changent également leur état sous l'influence de causes minimes. C'est plutôt le résultat de l'affaiblissement de l'affinité de l'eau pour les molécules des cristalloïdes que l'augmentation de l'affinité des molécules dans la micelle.

Cette définition indique aussi de la façon la plus nette ce qu'il faut entendre sous le nom de solution colloïde. Ce n'est pas tout simplement une *suspension* de la matière solide dans le dissolvant, comme le veulent certains auteurs, notamment

MM. Vanino et Stöckl<sup>1</sup> : les particules suspendues sont toujours visibles à l'œil nu ou au microscope, et sont, par conséquent, composées par un grand nombre de micelles. Ce n'est pas non plus une *pseudo-solution*. En employant ce terme, on semble définir la vraie solution comme une dissociation complète (allant jusqu'aux molécules) de la matière. Mais alors l'acide acétique serait en pseudosolution dans l'éther, ou l'acide chlorhydrique, dans l'acide formique, puisqu'ils s'y trouvent à l'état de molécules doubles. Et ne faudrait-il pas introduire encore le terme *hyper-solution* pour les électrolytes qui se dissocient dans l'eau, comme on sait, au delà des molécules. Les colloïdes donnent plutôt des *solutions micellaires*, où l'état d'équilibre entre le pouvoir dissociant du dissolvant et l'attraction mutuelle des particules solides est atteint lorsque les micelles sont séparées les unes des autres. C'est dans la nature des colloïdes de ne pas permettre l'existence simultanée des molécules libres ou des fractions micellaires dans de l'eau : *il est difficile de trouver un exemple de dissociation plus ou moins complète d'une micelle colloïde sans intervention d'une réaction chimique*. Même dans ce dernier cas, la dislocation des unités physiques demande souvent une action très énergique et prolongée du réactif chimique. Je ne rappellerai que la difficulté de préparer le chlorure d'aluminium par voie humide en partant de l'hydrate de ce métal<sup>2</sup>.

Enfin, des remarques qui précèdent, se dégage la notion de la relativité de la conception de l'état colloïde. En effet, les

1. *Zeitschrift f. physik. Chemie*, t. XXX, p. 98, 1899.

2. Dans l'introduction de son livre, *Mechanisch-physiologische Theorie der Abstammungslehre*, München und Leipzig, 1884, C. v. Nägeli a opposé le premier les solutions micellaires des albuminoïdes et des hydrates de carbone aux solutions moléculaires des cristalloïdes, et a vu, par conséquent, la différence essentielle entre les deux groupes de solides que nous nous efforçons de faire ressortir dans notre étude. Ce botaniste émérite n'a appliqué malheureusement sa conception qu'aux colloïdes d'origine biologique, et a eu peut-être le tort de lui donner une légère nuance vitaliste en parlant des solutions colloïdes comme d'un état « nouvel et organisé », p. 96. C'est à cela qu'il faut probablement attribuer le peu de succès d'une définition qui s'adapte le mieux à la grande majorité des faits observés chez les colloïdes. Il est vrai qu'elle semble préjuger arbitrairement une limite fixe à la désagrégation de ces matières, et se mettre ainsi en contradiction avec les observations de MM. Linder et Picton, qui ont décrit différents degrés de dissolution des colloïdes entre la pseudo-solution et la solution véritable. Or, si ces auteurs ont réellement démontré l'existence de particules colloïdes plus ou moins grandes suivant la composition du milieu, ils n'ont nullement prouvé que le changement de grosseur était dû à une *dislocation* des particules en solution. Nous aurons l'occasion d'y revenir.



matières qui ne se désagrègent pas dans l'eau peuvent quelquefois être dissociées par un autre dissolvant, et inversement, les corps se dissociant dans l'eau peuvent être insolubles dans d'autres liquides. A ce point de vue, il est intéressant de rapporter un fait observé en 1889 par M. Paterno <sup>1</sup>. Le tannin en solution aqueuse provoque un abaissement de la température de congélation correspondant à un poids des particules égal à 2643-3700. En solution dans l'acide acétique, on arrive par la méthode de Raoult à un poids moléculaire répondant à la formule normale  $C^{14}H^{11}O^9$ . Le tannin se comporte donc comme un cristalloïde dans l'acide acétique et comme un colloïde dans l'eau. De l'autre côté, les cristalloïdes solubles dans l'eau, comme la plupart des sels minéraux, par exemple, sont des matières colloïdes par rapport à l'alcool éthylique ou méthylique dans lesquels ils sont insolubles. Il est à prévoir qu'il serait possible d'obtenir des solutions micellaires de ces matières minérales dans les dissolvants organiques précités, qui posséderaient toutes les propriétés des solutions colloïdes.

Et maintenant une question bien naturelle se pose. Tous les albuminoïdes possédant des micelles qui ne se dissocient pas dans l'eau, à quoi est due la différence dans les conditions de solubilité que l'on constate chez les représentants divers de cette classe de colloïdes? Pourquoi, par exemple, les albumoses sont-elles toujours solubles dans l'eau distillée, tandis que l'albumine d'œuf ou la sérumalbumine l'est seulement dans le cas où on ne l'a pas soumise à une haute température? Pourquoi la caséine, les globulines ne s'y dissolvent-elles guère si l'on n'ajoute pas de petites quantités de sel, d'acide ou d'alcali? Pourquoi faut-il employer un acide minéral en solution faible pour dissoudre la vitelline, la caséine et l'histone, et pourquoi le même acide plus concentré les reprécipite-t-il de leurs solutions? et ainsi de suite.

Il doit y avoir une différence dans les propriétés des micelles d'origine diverse, et une variabilité des propriétés sous l'influence des agents auxquels nous soumettons les micelles en question. Mais alors, quelles sont ces propriétés, quels sont les facteurs capables de les modifier et en quoi peuvent consister ces modi-

fications? <sup>1</sup> Le présent mémoire est une contribution à la solution de ce problème.

## I

### PLAN ET MÉTHODE

Il n'y a guère de changement d'état des albuminoïdes où les substances minérales ne jouent d'une façon quelconque un rôle plus ou moins important. Les acides et les alcalis appartiennent aux dissolvants les plus employés pour les matières protéiques: les sels, suivant leur concentration, dissolvent quelques-uns et précipitent la plupart des albuminoïdes connus. La présence des sels est également nécessaire pour la production des phénomènes de coagulation soit par la chaleur, soit par les diastases spécifiques: il suffit, comme on sait, de priver le sang, le lait, ou les solutions des matières pectiques, de sels de chaux, pour paralyser presque complètement l'action de la plasmase, de la présure ou de la pectase, et on n'a qu'à diluer le blanc d'œuf de quelques volumes d'eau ou le soumettre à la dialyse prolongée pour qu'il perde sa faculté de se solidifier sous l'influence de la haute température. Et même l'insolubilité de l'histone, précipitée de ses solutions acides à l'aide de l'ammoniaque, dans un excès de ce réactif, phénomène auquel M. Kossel et ses élèves ont cru pouvoir attacher toute une série d'hypothèses aussi ingénieuses que répondant peu à la réalité — nous en aurons la preuve à la fin de ce travail — s'est montré en dernière analyse

1. Le lecteur a reconnu, sans doute, sous cette forme inusitée, la vieille question du rapport présumé entre les réactions physiques des albuminoïdes et leur constitution chimique, présomption qui a servi, comme on sait, de base à la classification des albuminoïdes, à la création des groupes d'albumine, de globuline, de vitelline, de caséine, d'histone, etc. Notre manière de poser la question s'en distingue toutefois par quelques points qui méritent d'être signalés brièvement.

En parlant des facteurs capables de modifier les propriétés de la micelle, nous attirons l'attention sur l'influence si négligée jusqu'ici du *milieu* sur les réactions physiques des albuminoïdes, et faisons concourir à la solution du problème toute une série de faits qui sont en contradiction avec les notions classiques, et qu'on a une tendance à écarter systématiquement comme des exceptions et des curiosités. Ensuite, amenés à reconnaître la possibilité des changements purement physiques de la micelle, nous espérons éviter l'écueil sur lequel sont venus échouer nombre d'auteurs, qui ont conclu à des réactions chimiques là où les phénomènes observés ne cadraient pas bien avec les propriétés généralement attribuées aux albuminoïdes. Nous en trouverons de nombreux exemples au cours de ce travail.

comme un cas banal de précipitation saline. M. Schultz<sup>1</sup> a, en effet, montré que si on lave le précipité de la globuline, insoluble dans l'excès d'ammoniaque, sur un filtre, cet albuminoïde entre en solution et peut être reprécipité à l'aide d'un peu de sel. M. Ivar Bang<sup>2</sup>, dans un travail récent sur l'histone, a confirmé cette observation également pour l'histone des globules rouges d'oie, isolée par la méthode de M. Kossel, et pour l'histone du thymus.

Il est donc naturel de s'adresser tout d'abord à l'analyse expérimentale de l'action des substances minérales sur la modification d'état des albuminoïdes. La voie à suivre dans ce genre de recherches est toute tracée. Il s'agit de dissoudre un albuminoïde dans des conditions bien définies, de varier ces conditions à tour de rôle, de façon à déterminer l'influence de chacune d'elles, sur l'état de l'albuminoïde à l'étude, et, enfin, de placer dans les mêmes conditions des albuminoïdes d'une autre constitution chimique pour se rendre compte du rôle joué par la structure moléculaire ou micellaire dans les phénomènes de solution, de précipitation et de coagulation.

Le succès de ces opérations et l'importance des résultats numériques obtenus sera, évidemment, subordonné au choix judicieux des albuminoïdes, et à l'exactitude de la méthode de détermination de la composition minérale du milieu dans lequel ces matières seront successivement placées. Ce sont ces deux points que nous allons discuter tout d'abord.

La plupart des auteurs qui ont étudié le rapport des sels aux albuminoïdes se sont adressés de préférence au sérum sanguin et au blanc d'œuf, à cause probablement de leur accessibilité et de leur importance physiologique. Il m'a semblé cependant préférable de laisser de côté ces liquides organiques qui, ayant de nombreuses fonctions à remplir dans l'organisme vivant, doivent déjà *a priori* être considérés comme des milieux éminemment complexes. Il y a là des facteurs, pour la plupart inconnus, qui viendraient inutilement compliquer nos expériences, en y introduisant au surplus toutes les difficultés parmi lesquelles se débat la chimie de ces milieux.

On a pu croire pendant assez longtemps, après les recherches

1. Der Eiweisskörper des Hämoglobins. *Ztsch. f. physiol. Ch.*, T. XXIV, p. 449.

2. Studien über Histon. *Ibid.* T. XXVII, p. 463, 4889.



de M. Hammarsten<sup>1</sup> sur le sérum du sang, que l'existence de deux albuminoïdes différents, de la paraglobuline et de la sérum-albumine, soit un fait des mieux établis : la paraglobuline serait insoluble dans l'eau et les solutions concentrées de sulfate de magnésie, soluble dans les sels alcalins de faible concentration, la sérumalbumine, soluble dans l'eau et non précipitable par le sulfate de magnésie ou par la dialyse. Ces deux corps ont même été érigés en types pour deux classes d'albuminoïdes, dont on n'a pas tardé à retrouver les représentants dans le blanc d'œuf et dans les extraits des cellules et des tissus. Or, déjà M. Burkhardt en 1882 (*Archiv. f. exp. Path. u. Pharm.*, T. XVI, p. 322) et M. Heynsius, en 1884<sup>2</sup>, ont remarqué que le précipité obtenu par saturation du sérum sanguin avec du sulfate de magnésie contient un albuminoïde soluble dans l'eau, même après la dialyse prolongée, et M. Marcus<sup>3</sup> tout récemment, en reprenant l'étude de ce phénomène, a non sans raison qualifié d'illogique la nomenclature courante des albuminoïdes. Il faudrait admettre, en effet, l'existence de globulines solubles dans l'eau ou au contraire d'albumines précipitables par le sulfate de magnésie.

D'un autre côté, MM. Corin et Bérard<sup>4</sup>, Corin et Ansieux<sup>5</sup> ont montré que si l'on chauffe très lentement le sérum sanguin ou le blanc d'œuf, débarrassés de leurs globulines par saturation avec du sulfate magnésien, le liquide commence à devenir opalescent et les flocons apparaissent. A ce moment précis on peut, par une agitation et un refroidissement énergiques, faire rétrocéder le processus commençant de coagulation, et réobtenir une solution limpide de l'albumine. Mais ce qui est surtout curieux dans cette expérience, c'est que la solution de l'albumine refroidie a acquis après ce traitement la propriété de précipiter par le sulfate de magnésie. Nous voyons donc dans ce cas une transformation directe de l'albumine en globuline.

Mais, nous objectera-t-on, ce n'est que l'effet de la *dénaturation* de l'albumine sous l'influence de la chaleur; on pourrait,

1. Ueber das Paraglobulin, *Pflüger's Archiv.*, T. XVII, 1878, p. 413; T. XVIII, p. 38.

2. Ueber das Verhalten der Eiweissstoffe zu Salzen von Alkalien u. von alkalischen Erden, *Pflüger's Archiv.*, T. XXXIV, p. 330.

3. Ueber in Wasser lösliches Serumglobulin, *Z. f. physiol. Chemie*, T. XXIII, p. 55 (1899).

4. *Bulletin de l'Académie royale de Belgique*, 3<sup>e</sup> série, T. XV, p. 643 (1888).

5. *Ibid.* T. XXI, p. 355 (1894).

d'ailleurs, obtenir le même résultat en traitant l'albumine avec un acide ou un alcali à chaud et même à froid, ce qui la transformerait en acide ou alcali-albuminate, lesquels albuminoïdes *dénaturés* précipitent aussi sous l'influence du sulfate de magnésie.

Tout en constatant la commodité du terme qui nous permet de mettre à la charge de la nature les difficultés que nous éprouvons pour expliquer certains phénomènes, je pense, cependant, que la *dénaturation* elle-même ne peut pas être admise sans quelques explications préalables.

On sait que la transformation en acidalbumine est d'autant plus facile que l'acide employé est d'une concentration plus forte et que l'acidalbumine est caractérisée entre autres par la non coagulation de ses solutions acides. Prenons donc deux portions égales de blanc d'œuf, dilué d'un volume d'eau et filtré, mélangons-les avec leur volume d'acide chlorhydrique à 0,3 pour cent et à 3 pour cent — les mélanges restent limpides — et chauffons-les pendant quelque temps au bain-marie bouillant. On pourrait croire que la deuxième portion mettra moins de temps pour se transformer en syntonine que la première, dont la teneur en acide est dix fois moindre, et que s'il y a coagulation, c'est celle-ci qui la présentera. Or c'est juste l'inverse que l'on observe. La portion la plus riche en acide a coagulé comme le blanc d'œuf initial, celle qui était plus pauvre en acide est restée parfaitement claire et a acquis la propriété de précipiter sous l'influence des sels. Ce phénomène ne peut donc être attribué à la dénaturation. Comment alors coordonner tous ces faits contradictoires?

Il est curieux de noter, entre parenthèses, que quel que soit le traitement auquel on soumet les albumines et les globulines d'origine diverse, on retrouve toujours aux corps altérés des propriétés physiques très analogues, qui les rapprochent singulièrement de la caséine. Les alcalialbuminates, les syntonines classiques, le corps précipité par M. Starke<sup>1</sup> des solutions opalescentes du blanc d'œuf, dialysé à fond et chauffé jusqu'à 70° avec quelques gouttes d'acide dilué, le corps qui est en solution dans de l'acide chlorhydrique à 0,3 0/0 dans notre expérience d'il y a un instant, l'albumine pure de Denis, ainsi que la

1. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphologie und Physiologie in München. 1897. Heft 1.

vitelline après un contact prolongé avec de l'eau, tous ces corps sont insolubles dans l'eau distillée, dans les acides concentrés et les sels, solubles dans les acides faibles et les alcalis. En présence de ces faits on est tenté de se demander, en renversant la filiation des phénomènes, s'il ne faut pas voir dans les propriétés spécifiées plus haut la *vraie nature* de la plupart des albuminoïdes, et si les différences qui ont amené les auteurs à la création des groupes albumines, globulines, vitellines, etc., ne sont pas dues à la *dénaturation de matières protéiques aux propriétés physiques très analogues, sous l'influence du milieu dans lequel elles se trouvent normalement*. On verra plus loin que cette interprétation a toutes les chances d'être exacte.

Ces quelques remarques, qui nous seront très utiles au cours de la discussion ultérieure, expliquent suffisamment notre abstention envers le sérum sanguin et le blanc d'œuf : elles n'indiquent pas, cependant, pourquoi notre choix s'était porté sur *les albuminoïdes de réserve des graines végétales*.

Plus on étudie les matières protéiques extraites des graines de semence, plus difficile devient leur classement dans la série des albuminoïdes connus. Ce fait a été constaté d'une façon presque unanime par les auteurs des traités de chimie biologique. Suivant les méthodes employées pour leur extraction et leur étude, on a classé les albuminoïdes de réserve d'origine végétale parmi les caséïnes (Ritthausen<sup>1</sup>), parmi les vitellines (Weil<sup>2</sup>, Hoppe-Seyler), parmi les vitellines et albumoses (Vines<sup>3</sup>, Martin<sup>4</sup>), parmi les vitellines spéciales ressemblant par quelques-unes de leurs propriétés aux albumoses (Palladine<sup>5</sup>). Les auteurs américains, avec M. Osborne<sup>6</sup> en tête, ont su en isoler des globulines, des albumines, des albumoses et des peptones. Enfin, M. Hammarsten, en appliquant à cette question des idées nouvelles et en se basant sur les résultats de la digestion pepsique des albuminoïdes de réserve, les a classés parmi les pseudo-nucléoprotéïdes.

1. *Die Eiweisskörper der Getreidearten, etc.*, Bonn, 1872.

2. *Zeitsch. f. physiol. Ch.*, T. I, p. 72.

3. *Proceedings of the Royal Soc. of London*, T. XXX, p. 387, 1880.

4. *Ibid*, T. XLII, 1889.

5. *Zeitschrift f. Biologie*, T. XIII, N. F. p. 191, 1895.

6. *J. of Amer. Chem. Soc.*, T. XV, XIX, XX et suivants.

7. *Wiman*, Studien über Legumin. Referat von Hammarsten, *Maly's Jahresberichte*, 1897, T. XXVII, p. 21.



Or, malgré ces dénominations diverses, les albuminoïdes isolés d'une graine par différentes méthodes sont et restent toujours les mêmes, et la faculté très prononcée qu'ils manifestent de prendre des aspects variables sous l'influence des conditions extérieures les fait particulièrement aptes aux études que nous nous proposons d'entreprendre.

Un autre avantage présenté par les albuminoïdes d'origine végétale est en rapport avec ce fait que les différentes graines contiennent des matières protéiques de réserve se distinguant par leur constitution chimique. En traitant donc ces graines par la même méthode, on peut obtenir une série de corps albuminoïdes d'une analogie physiologique incontestable — ils appartiennent tous aux grains d'aleurone — et qui sont assez différents par leur composition chimique pour qu'on soit en mesure de les étudier comparativement au point de vue des propriétés physiques de leurs micelles.

J'ai eu l'occasion, dans un travail antérieur<sup>1</sup>, d'insister sur l'influence probable des matières ternaïres de réserve sur la solubilité des albuminoïdes de la graine dans l'eau distillée. Il y a été indiqué entre autres que quelques graines huileuses, débarrassées complètement de leurs matières grasses, n'abandonnent à l'eau que des quantités minimales d'albuminoïdes; l'exemple des graines du sapin rouge (*Picea excelsa*) y fut cité. Ces graines ne se comportent pas autrement envers les solutions des sels alcalins à 10 0/0<sup>2</sup> qui servent habituellement pour l'extraction des vitellines, et ne permettent l'isolement de leurs albuminoïdes qu'avec les acides d'une concentration faible et les alcalis. Il me semblait dès lors indiqué de commencer mes recherches justement par l'étude des albuminoïdes du sapin rouge. En choisissant un corps possédant dès son origine les caractères d'une matière protéique dénaturée, j'espérais me mettre d'avance à l'abri des objections de toute sorte, tirées de la classification routinière des albuminoïdes et de la théorie de la dénaturation. La base de la discussion une fois

1. Sur le premier produit d'organisation de l'acide phosphorique dans les plantes à chlorophylle, *Revue générale de botanique*, t. XII, p. 5, 1900.

2. M. Rongger (*Ueber die Bestandtheile der Samen v. Picea excelsa. Landw. Versuchs*, 1898, p. 89) n'a pu extraire que 4 grammes à peu près de 250 grammes de graines pulvérisées et débarrassées de la plus grande partie de leurs matières grasses. Le rendement devient tout à fait insignifiant si l'on a soin d'éloigner complètement ces matières ternaïres.

trouvée, j'ai étendu mes recherches à des albuminoïdes d'autre provenance<sup>1</sup>.

J'arrive maintenant à la *méthode de détermination de la composition minérale du milieu*. Celle qui a servi pour mes recherches était fort simple. 2 c. c. d'une solution des albuminoïdes de réserve à 1 0/0, dans de l'acide chlorhydrique ou de la soude d'une concentration donnée, sont versés dans un tube à essai. On y fait arriver goutte par goutte, en agitant, une solution d'acide ou de sel d'une concentration connue, à l'aide d'une burette bien graduée, de façon à pouvoir connaître exactement le volume de la solution saline ajouté et, par conséquent, aussi la quantité d'acide ou de sel. Les burettes sont assez étroites, et graduées de manière à permettre la lecture de 1/100<sup>e</sup> c. c. On ajoute du sel jusqu'au moment où les flocons d'albuminoïdes cessent de disparaître après l'agitation, et on note alors le volume de solution saline ajouté.

Dans la plupart des cas, ce moment est très facile à reconnaître, car jusqu'à la dernière goutte qui provoquera l'apparition persistante des flocons, la solution reste parfaitement limpide, et la formation des flocons sous l'influence de la dernière goutte saline est très abondante. Dans d'autres cas plus rares, et surtout lorsqu'il s'agit de sels organiques ou de solutions alcalines, le liquide devient opalescent déjà au commencement de l'expérience. Cependant, avec un peu d'exercice et à condition de travailler dans une chambre bien éclairée, on arrive sans trop de peine à bien distinguer le moment d'apparition du précipité insoluble.

Le volume de solution du sel qu'on est obligé d'ajouter à 2 c. c. de solution de l'albuminoïde une fois connu, il est facile de calculer la concentration du sel en pour cent dans l'éprouvette au moment de l'apparition persistante des flocons, ensuite la concentration dite moléculaire, la concentration normale du sel étant prise comme unité.

Il est important de faire remarquer que les chiffres obtenus n'indiquent point la concentration du sel dans laquelle l'albumi-

1. Tous ces albuminoïdes ont été préparés par la méthode dite de Ritthausen : extractions des graines pulvérisées par la soude à 0, 2 0/0 et précipitation par l'acide acétique.

noïde en question est complètement insoluble, les flocons apparus ne représentant qu'une partie très grande, il est vrai, mais non la totalité de l'albuminoïde dissous dans l'acide ou dans la soude. Les expériences instituées à cet égard, et que je communiquerai plus loin dans un tableau spécial, montrent que la concentration du sel augmente avec la dilution de l'albuminoïde, quoique plus lentement que cette dernière. C'est ainsi, pour prendre un exemple concret, qu'une solution des albuminoïdes de réserve du sapin rouge à 1 0/0 dans de l'acide chlorhydrique à 1 0/00 donne des flocons abondants, lorsque la concentration moléculaire du chlorure d'ammonium ajouté est de 0,385; la concentration reste la même avec une solution des albuminoïdes à 0,5 0/0; elle monte à 0,419 pour une solution des albuminoïdes à 0,25 0/0, à 0,493 pour une solution à 0,125 0/0 et, enfin, à 0,537 pour une solution des albuminoïdes à 0,0625 0/0. Le même rapport se retrouve pour d'autres sels. On comprend donc aisément que le chlorure d'ammonium ajouté jusqu'à la concentration moléculaire 0,385, lequel nombre sera seul marqué dans nos séries, précipite tout au plus les trois quarts de l'albuminoïde en solution.

Les nombres précédents nous montrent aussi qu'il est nécessaire d'éviter des variations notables dans la concentration des matières protéiques, si l'on veut avoir des résultats comparables. C'est pourquoi, dans toutes nos expériences, sauf quelques cas exceptionnels, on n'ajoutait pas plus de 2 c. c. de réactif. La concentration ne variait, par conséquent, que dans les limites extrêmes de 1 à 0,5 0/0 et l'erreur imputable à la méthode, à cause de la nécessité d'ajouter des quantités variables de solution saline dans les expériences parallèles, devenait ainsi tout à fait insignifiante<sup>1</sup>.

4. Pour l'étude du rapport des sels et des albuminoïdes, M. Nasse, M. Hofmeister et ses élèves se sont servis d'autres méthodes, conçues en vue de pouvoir travailler avec des concentrations identiques de ces derniers corps. M. Nasse (*Pflüger's Archiv*, t. XLI, 504, 1887) ajoute une goutte d'albuminoïde à 10 c. c. de solutions salines à concentration croissante, placées dans des éprouvettes, et distribue par des mouvements doux cette goutte dans la couche supérieure du liquide. La concentration du sel dans l'éprouvette où la goutte provoque pour la première fois un trouble est regardée comme celle qui précipite l'albuminoïde à l'étude.

Cette méthode est franchement mauvaise. Il est difficile de distinguer un trouble d'une opalescence; ce dernier phénomène cependant ne coïncide pas toujours avec la concentration nécessaire à la précipitation, comme nous l'avons vu plus haut.



## II

SUR LES ALBUMINOÏDES DE RÉSERVE DE PICEA EXCELSA EN SOLUTION ACIDE.

— DISCUSSION DES RÉSULTATS NUMÉRIQUES. — IONS SOLUBILISATEURS, MOLECULES NON DISSOCIÉES, AGENTS PRÉCIPITANTS

Les résultats numériques des recherches qui font l'objet de ce travail sont rassemblés dans une série de tableaux que nous allons passer en revue.

Le tableau I résume les expériences faites avec une solution des albuminoïdes du sapin rouge à 1 0/0 dans de l'acide chlorhydrique à 1 0/00.

M. Hofmeister (*Arch. f. exp. Path. u. Pharmac.*, t. XXIV, p. 247, 1888) et M. Lewith (*Ibidem*, p. 1) distribuent la solution de l'albuminoïde dans des éprouvettes, à raison de 2 c. c. dans chacune. Ils versent dans ces tubes des volumes croissants d'une solution saturée de sel, et remplissent tous les tubes jusqu'à la concurrence de 10 c. c. Si après agitation le précipité formé tout d'abord se dissolvait dans l'eau surajoutée, la concentration du sel dans l'éprouvette examinée était au-dessous de celle qui est nécessaire à la précipitation. Quelques essais permettent facilement de trouver la concentration voulue du sel, et on a l'avantage de la connaître toujours pour la même concentration de l'albuminoïde.

Or, cette méthode assez maniable, lorsque le nombre d'expériences n'est pas très notable, devient peu commode s'il s'agit d'une grande quantité de détermination avec des sels et albuminoïdes différents. Chaque expérience demande une série de tubes, et, pour des essais tels que ceux sur l'influence de la température par exemple, les séries seraient à recommencer plusieurs fois. De plus, la méthode de M. Hofmeister implique une erreur peut-être plus marquée que celle qui est due à la variation de la concentration de l'albuminoïde. La matière protéique en solution vient en contact avec une quantité de sel supérieure à celle nécessaire à sa précipitation, et ceci suffit pour modifier la solubilité de l'albuminoïde dans l'eau. On peut s'en assurer de la façon suivante : On détermine par notre méthode la quantité de sel qu'il faut ajouter à 2 c. c. de solution de l'albuminoïde du sapin rouge à 1 0/0 dans HCl, à 1 0/00, on ajoute encore une fois autant de sel et on laisse reposer pendant quelques minutes. On peut constater alors que 2,5 c. c. d'eau distillée, tout en ramenant la concentration du sel au-dessous du nombre obtenu dans le premier essai, n'arrivent guère à dissoudre le précipité. Pour obtenir cet effet, il faut ajouter encore de l'eau ou agiter pendant très longtemps. Ce phénomène est dû probablement à ce que l'eau a à réagir non seulement contre les facteurs dont dépend la solubilité ou l'insolubilité de la micelle albuminoïde, mais aussi contre l'agglomération des micelles insolubles en flocons.

TABLEAU I

<sup>2</sup> C. C. <i>Picea excelsa</i> , Solution des albuminoïdes de réserve à 1 p. c. dans HCl à 1 p. m.									
C. R.	RÉACTIF	P. M.	De 8 à 10° C.			Température d'ébullition.			$\frac{b}{a}$
			V. R.	C %	C. M. <sub>a</sub>	V. R.	C %	C. M. <sub>b</sub>	
10 0 0	HCl	36,438	0,33	1,445	0,388	0,61	2,335	0,640	1,65
20 0 0	NH <sub>4</sub> Cl	33,52	0,23	2,06	0,385	0,39	3,26	0,609	1,58
"	NaCl	38,5	0,21	1,9	0,325	0,35	2,98	0,509	1,57
"	KCl	74,59	0,33	2,83	0,380	0,58	4,5	0,603	1,59
"	1/2 MgCl <sub>2</sub>	47,62	0,16	1,48	0,311	0,23	2,06	0,432	1,39
"	1/2 SrCl <sub>2</sub>	79,26	0,34	2,90	0,366	0,55	4,31	0,544	1,48
"	1/2 BaCl <sub>2</sub>	104,15	0,55	4,31	0,414	0,97	6,53	0,627	1,51
10 0 0	NH <sub>4</sub> Br	98,03	0,58	2,25	0,230	4,68	4,56	0,465	2,02
"	NaBr	103,01	0,52	2,06	0,200	4,30	3,56	0,363	1,81
"	KBr	119,4	0,65	2,45	0,206	4,90	4,87	0,409	1,99
"	NaI	149,91	0,23	1,03	0,069	0,95	3,22	0,216	3,43
"	KI	166,00	0,39	1,63	0,098	1,80	4,73	0,285	2,91
"	HNO <sub>3</sub>	63,048	0,19	0,865	0,137	0,59	2,28	0,361	2,63
"	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80,11	0,24	1,07	0,135	0,90	3,105	0,387	2,87
"	NaNO <sub>3</sub>	88,09	0,22	0,99	0,116	0,76	2,75	0,323	2,78
"	KNO <sub>3</sub>	101,48	0,32	1,38	0,136	1,32	3,97	0,392	2,86
"	1/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	49,038	0,07	0,339	0,0714	∞	∞	∞	∞
"	1/2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	66,4	0,05	0,244	0,0376	0,14	0,65	0,097	2,6
8 0 0	1/2 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	71,08	0,05	0,195	0,0274	0,15	0,56	0,078	2,84
10 0 0	1/2 K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	87,17	0,07	0,339	0,0402	0,19	0,865	0,099	2,46

Le lecteur voudra bien ignorer pour quelques instants la partie droite du tableau, qui représente les nombres obtenus à la température d'ébullition, et ne s'occuper que de la partie gauche faite à la température de 8 à 10° C. De toutes les colonnes de chiffres qu'on y trouve, la dernière, imprimée en caractères gros et marquée d'un *a* à la tête, est la plus importante. Elle représente les concentrations moléculaires C. M. des sels dans lesquels le précipité albuminoïde devient persistant après l'agitation. La première colonne indique la concentration du réactif employé C. R.; la deuxième et la troisième, le réactif et son poids moléculaire P. M.; la quatrième, le volume du réactif, ajouté en centimètres cubes V. R.; enfin, la cinquième, la concentration du sel nécessaire à la précipitation calculée en pour cent, C 0/0.

Nous y avons donc tous les éléments pour la vérification des calculs et pour l'orientation facile.

Il est à peine nécessaire d'ajouter que chaque nombre présente la moyenne d'au moins deux déterminations bien concordantes. L'expérience fut répétée et donna le même résultat avec une préparation des albuminoïdes de sapin rouge d'une autre provenance.

En examinant la partie gauche du tableau, on est tout d'abord frappé par la quantité faible de substance minérale qu'il faut ajouter pour obtenir un précipité d'albuminoïdes de réserve de *Picea excelsa* en solution acide. Il n'en faut que 1,415 0/0 de l'acide chlorhydrique, que 2 0/0 du chlorure d'ammonium et ainsi de suite. Pour les iodures, la quantité de sel est de 1 0/0 à peu près et pour les sulfates de 1/3 0/0.

Ensuite, on est surpris de voir la concentration moléculaire pour les sels du même acide varier dans des limites très étroites. Pour l'acide chlorhydrique, la concentration est de 0,388, pour le chlorure d'ammonium 0,385, pour le chlorure de potassium 0,380; pour le chlorure de sodium, la concentration moléculaire baisse notablement, elle n'est que 0,325. J'avoue qu'au commencement de mes recherches je fus désagréablement impressionné par cette exception à la règle qui semblait découler des nombres qui précèdent. L'expérience fut répétée plusieurs fois, la burette qui a servi pour le sel marin et dont la graduation m'était devenue suspecte fut changée: on a préparé une autre



solution de chlorure de sodium : le résultat restait le même.

Le même phénomène s'observe pour les sels de sodium des autres acides et pour tous les albuminoïdes examinés par moi, comme on le verra aux tableaux suivants. C'est donc bien une propriété des sels de sodium de précipiter en moindre concentration les albuminoïdes de leurs solutions acides. Ce fait, comme les oscillations positives et négatives pour les sels de magnésium, de strontium et de baryum, est un de ceux qui demandent une explication.

Il s'agit maintenant de rechercher, par la discussion raisonnée des nombres précités, à quoi peut bien être due la précipitation des albuminoïdes par les acides et les sels ? Examinons le cas le plus simple. Une solution des albuminoïdes de réserve du sapin rouge dans de l'acide chlorhydrique à 1 0/00 est précipitée lorsque la concentration de l'acide monte à 1,415 0/00. Il n'y a que trois matières en présence dans cette expérience : l'albuminoïde, l'eau et l'acide, et par un mécanisme qu'il importe d'élucider, l'acide qui favorisait au commencement de l'expérience la solubilisation de l'albuminoïde dans l'eau n'agit plus lorsque sa concentration est devenue plus grande. Le simple bon sens nous recommande de chercher la cause de ce phénomène dans les modifications des propriétés de l'acide sous l'influence de l'augmentation de la concentration. Parmi ces propriétés, la *conductibilité électrique* est assurément la plus curieuse.

On sait que l'acide chlorhydrique à l'état sec, ainsi que l'eau chimiquement pure, est rebelle au passage du courant électrique. Ces deux substances mélangées ensemble deviennent conductrices de l'électricité. On attribue l'apparition de cette nouvelle propriété physique à la *dissociation électrolytique* dont nous avons parlé déjà plus haut, à la faculté que possèdent les molécules inertes de certaines substances (sels, bases et acides minéraux et organiques, électrolytes en un mot) de se dissocier dans l'eau en particules actives, porteurs d'une charge électrostatique positive ou négative, et qui sont désignées sous le nom d'*ions*.

La conductibilité électrique étant provoquée par la dissociation électrolytique, on conçoit facilement qu'elle augmentera avec la concentration de l'électrolyte, avec la quantité des molécules dissociées ou, autrement dit, avec le nombre des ions

libres. Or, de nombreuses mensurations ont montré que si la conductibilité électrique augmente réellement avec la concentration de l'électrolyte, elle n'est pas directement proportionnelle à cette dernière et croît beaucoup plus lentement. De là deux conséquences qu'il est important de bien retenir :

1<sup>o</sup> Quelle que soit la concentration d'une solution d'un électrolyte, excepté les solutions extrêmement diluées, il y a toujours une quantité plus ou moins grande des molécules non dissociées ;

2<sup>o</sup> Le nombre des molécules non dissociées par rapport aux molécules ionisées est d'autant plus grand que la solution est moins concentrée.

Nous ne pouvons pas entrer ici dans les détails de la théorie de la dissociation électrolytique développée pour la première fois par M. Arrhenius<sup>1</sup>. Nous dirons seulement qu'on peut facilement calculer, en partant de la conductibilité électrique, le degré de dissociation et d'après l'équation où  $\lambda$  représente la conductibilité

$$\alpha = \frac{\lambda}{\lambda_{\infty}}$$

moléculaire,  $\lambda_{\infty}$  la conductibilité électrique dans des solutions extrêmement diluées (pouvant, par conséquent, être regardées comme complètement dissociées) qui est égale à la somme des mobilités  $u+v$  des deux ions, d'après la loi de Kohlrausch sur la pérégrination indépendante des ions.

A l'aide de cette équation, et en consultant les tableaux de conductibilité des électrolytes<sup>2</sup>, on peut s'assurer que le degré de la dissociation électrolytique d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 0/00 dont la concentration moléculaire est de 0,0273, est à peu près égal à 0,95, c'est-à-dire que, sur 100 molécules de HCl en solution, 95 sont dissociées. Le rapport des molécules dissociées et non dissociées est donc de 19. Le degré de dissociation de HCl à 1,415 0/0 (0,388 concentration moléculaire) est égal à 0,86, et le rapport des molécules dissociées et non dissociées n'est, par conséquent, que de 6.

Il y a donc une grande différence dans le rapport des molé-

1. Ueber die Dissociation der in Wasser gelösten Stoffe, *Z. f. physikal. Chemie*, t. I, p. 631, 1887.

2. Nous nous sommes servis des tableaux composés par MM. Kohlrausch et Holborn : *Das Leitvermögen der Electrolyte*, Leipzig, 1898.

cules dissociées et non dissociées dans les deux cas, et la première idée qui vient en présence de cette constatation est que ce sont les ions qui possèdent la faculté de solubiliser la micelle albuminoïde, et ce sont les molécules non dissociées qui empêchent cette solubilisation. Il y aurait comme une lutte, au fond de notre éprouvette, entre les ions et les molécules non dissociées pour la possession de la micelle albuminoïde. Dans le cas de la victoire des ions libres, les micelles resteraient en solution ; dans le cas contraire, les micelles vont s'agglomérer et devenir insolubles. Mais, pour chaque électrolyte, la force relative des molécules et des ions serait plus ou moins constante.

Eh bien, cette explication, qui nous permet de poursuivre le phénomène si obscur de l'action des substances minérales sur la solubilité et l'insolubilité d'un albuminoïde dans le monde même invisible des molécules, a encore un avantage dont ne peuvent se vanter beaucoup d'hypothèses proposées dans l'histoire des matières protéiques. Elle est susceptible d'être démontrée par l'expérience. Les conséquences que nous tirerons de notre hypothèse non seulement seront vérifiées par l'observation directe, mais nous amèneront à la découverte de faits nouveaux qui serviront au développement de l'hypothèse elle-même.

### III

PREUVES TIRÉES DES PHÉNOMÈNES D'ADDITION ET DES EFFETS DE DILUTION  
DES ÉLECTROLYTES. SUBSTITUTION D'UN ÉLECTROLYTE A DISSOCIATION  
TRÈS FORTE PAR UN AUTRE QUI DISSOCIE FAIBLEMENT

Voyons d'abord si l'action des différents réactifs, notés dans le tableau I, va s'additionner. Ajoutons à 2 c. c. de la même solution des albuminoïdes, qui nous a servi pour la composition du tableau I, 0,11 c. c. de HCl, au lieu de 0,33 nécessaires pour obtenir un précipité, et cherchons à déterminer la quantité de chlorure d'ammonium ou de sodium qu'il faut encore ajouter pour produire la précipitation.

A première vue, on devrait s'attendre à ce que le volume de la solution à ajouter pour produire l'effet désiré fût égal à deux tiers de celui qui est marqué au tableau. Ainsi, ce volume étant



de 0,21 c. c. pour le chlorure de sodium et de 0,23 pour le chlorure d'ammonium, on devrait s'attendre à trouver le volume ajouté égal à 0,14 c. c. pour le premier de ces sels, et à 0,15 pour le second. Il n'en est rien en réalité. Pour obtenir la précipitation dans les conditions de cette expérience, il nous faut un volume beaucoup plus considérable, exactement 0,17 c. c. pour le NaCl et 0,18 pour le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Si l'on prend, au lieu de 0,11 c. c. d'acide chlorhydrique, deux fois autant, le volume des sels à ajouter sera de 0,12 c. c. au lieu de 0,07 et 0,08 calculés.

Le même phénomène s'observe également avec d'autres sels, et quelques-unes de mes expériences à cet égard sont consignées dans le tableau II.

TABLEAU II

HCl.	0,11 c. c.	NaCl.	0,17	au lieu de	0,14 c. c.
«	0,22 «	«	0,12	«	0,07 «
«	0,11 «	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,18	«	0,15 «
«	0,22 «	«	0,12	«	0,08 «
NaCl.	0,07 «	KCl.	0,27	«	0,22 «
«	0,14 «	«	0,22	«	0,11 «
NaBr.	0,18 «	KBr.	0,32	«	0,44 «
«	0,36 «	«	0,35	«	0,22 «
$\text{HNO}_3$	0,10 «	$\text{KNO}_3$	0,22	«	0,16 «
«	0,15 «	«	0,16	«	0,08 «

Il ne serait pas juste de chercher la cause de cette prétendue irrégularité dans les défauts de la méthode elle-même. Le tableau III, qui présente les résultats obtenus avec quelques acétates, va nous indiquer à peu près la précision et l'exactitude que l'on est en droit d'attendre de notre méthode si simple. On voit dans ce tableau que la concentration moléculaire des acétates est encore moindre que celle des sulfates, et qu'elle approche très sensiblement de la concentration moléculaire de l'acide chlorhydrique à 1 0/00 qui est égale à 0,0273.

TABLEAU III

2 G. G. <i>Picea excelsa</i> . Solution à 1 p. c. dans HCl à 10/00.				
RÉACTIF à 20,0.	P.M.	A LA TEMPÉRATURE VOULUE		
		V.R.	C 0/0	C.M.
$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	82	0,25	0,222	0,0271
$\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	98	0,29	0,253	0,0260
$1/2 \text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	79	0,24	0,216	0,0273
$1/2 \text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	127,5	0,44	0,361	0,0283

Rien d'étonnant dans cette coïncidence. HCl, acide plus énergétique, remplace l'acide acétique dans les sels ajoutés, et nous n'avons plus qu'une solution des albuminoïdes dans de l'acide acétique de la même concentration moléculaire. Or, l'acide acétique d'une concentration aussi faible dissout, comme on peut s'en assurer par l'expérience, tout au plus un tiers pour cent des albuminoïdes de *Picea excelsa*. Le précipité obtenu n'est donc pas le résultat d'une précipitation saline de l'ordre étudié par nous, mais bien une modification d'état due au changement du milieu dissolvant.

Les nombres marqués au tableau nous certifient cependant que l'erreur de la méthode ne se manifeste que dans la troisième décimale de la concentration moléculaire, et ne dépasse pas une unité dans un ou dans l'autre sens, du moins dans les conditions de cette expérience. Quant aux phénomènes d'addition dans le cas des acétates, où il ne s'agit, en somme, que d'une réaction purement chimique, on constate que les chiffres du deuxième sel trouvés coïncident presque avec ceux qui sont calculés.

$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	0,03 c. c.	$\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	0,23	au lieu de	0,232 c. c.
"	0,15 "	"	0,12	"	0,116 "
"	0,10 "	$\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	0,28	"	0,264 "
"	0,20 "	"	0,09	"	0,088 "

Ce n'est donc pas à la méthode que sont dus les écarts observés précédemment. Ils trouvent leur explication et même une impérieuse raison d'être dans notre hypothèse et les consi-

dérations qui en découlent. Lorsque deux électrolytes sont dissous ensemble dans une quantité donnée d'eau, chacun d'eux se dissocie comme s'il était seul en solution<sup>1</sup>. Or, en ajoutant un tiers de l'acide chlorhydrique nécessaire pour la précipitation, nous n'avons pas introduit un tiers des molécules non dissociées, mais beaucoup moins, car plus faible est la solution d'un électrolyte, plus grand devient le rapport entre les molécules dissociées et non dissociées. Les deux tiers du sel surajouté ne contiennent pas non plus les deux tiers des molécules inertes qui seules, d'après notre hypothèse, sont capables de lutter contre l'action dissolvante des ions libres. Force nous est d'augmenter la quantité du sel surajouté pour accroître en même temps le nombre des molécules non dissociées. L'équilibre n'aurait pu être atteint qu'à cette condition<sup>2</sup>.

Nous avons vu plus haut que la quantité de sel qu'il faut ajouter à une solution des albuminoïdes dans de l'acide chlorhydrique dépend en partie aussi de la concentration de la matière

TABLEAU IV a

2 C. C. <i>Picea excelsa</i> . Solution des albuminoïdes de réserve.								
RÉACTIF 20 %	à 1/2 % dans HCl 1 %		à 1/4 % dans HCl 1 %		à 1/8 % dans HCl 1 %		à 1/16 % dans HCl 1 %	
	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.
HCl	0,33	0,388	0,35	0,408	0,38	0,436	0,45	0,507
NH <sub>4</sub> Cl	0,23	0,385	0,25	0,416	0,32	0,514	0,34	0,543
KCl	0,33	0,380	0,37	0,419	0,45	0,493	0,50	0,537
MgCl <sub>2</sub>	0,46	0,311	0,47	0,331	0,20	0,383	0,24	0,451

1. Ceci n'est vrai que d'une façon approximative. L'existence d'un ion commun aux deux sels a pour effet d'abaisser un peu la dissociation.

2. A la suite de leurs recherches sur la précipitation du sulfure d'arsenic MM. Linder et Picton arrivent à la conclusion que « *when salts of the same group are added successively to produce coagulation, the effect is additive* (comme dans le cas des acétates dans nos expériences), *but with salts of different groups this is no the case.* » *J. of Chem. Soc.* V. 67 p. 67, 1895.

Je n'ai pu confirmer la première partie de cette proposition pour aucun des albuminoïdes étudiés par moi. Les matières protéiques de réserve des semences de courge, de lupin blanc et jaune, le blanc d'œuf se comportaient vis-à-vis des sels alcalins exactement comme les albuminoïdes du sapin rouge.



protéique, et nous avons cité les nombres pour le chlorure d'ammonium. Le tableau IV *a* résume les expériences faites avec l'acide chlorhydrique et d'autres sels.

Au lieu de diluer la solution des albuminoïdes de *Picea excelsa* avec HCl à 1 0/00, diluons-la avec de l'eau distillée, de façon à avoir des solutions des albuminoïdes à 1/2 0/00, à 1/4 0/0 dans HCl à 1/4 0/00, et ainsi de suite. Il s'agit de savoir maintenant s'il nous faut, pour précipiter ces solutions, ajouter respectivement plus de sel que dans le cas précédent, ou moins. Evidemment moins, et voici pourquoi. Si la concentration de l'acide chlorhydrique qui nous sert pour la dissolution des albuminoïdes est de 1 0/00, en ajoutant du sel nous luttons, d'une part, contre les molécules ionisées de l'acide, d'autre part, contre les ions du sel introduit, puisqu'il nous est matériellement impossible de dissoudre un sel sans avoir provoqué en même temps sa dissociation électrolytique. En diluant l'acide avec 1, 3, 7 volumes d'eau nous augmentons relativement le nombre des molécules ionisées; en revanche, la quantité absolue des ions est diminuée. Il nous faut donc, pour atteindre l'équilibre, moins de molécules salines inertes que dans le cas de l'acide chlorhydrique à 1 0/00.

C'est ce qui ressort, en effet, du tableau IV *b*, où nous

 TABLEAU IV *b*.

2 C. C. <i>Picea excelsa</i> . Solution des albuminoïdes de réserve								
	à 1/2 0/0 dans HCl 1/2 0/00		à 1/4 0/0 dans HCl 1/4 0/00		à 1/8 0/0 dans HCl 1/8 0/00		à 1/16 0/0 dans HCl 1/16 0/00	
RÉACTIF 20 0/0	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.
HCl	0,34	0,397	0,36	0,419	0,40	0,458	0,44	0,507
NH <sub>4</sub> Cl	0,23	0,385	0,25	0,416	0,26	0,430	0,26	0,430
KCl	0,30	0,350	0,32	0,371	0,35	0,399	0,35	0,399
MgCl <sub>2</sub>	0,16	0,311	0,16	0,311	0,18	0,347	0,19	0,365

constatons que la concentration du chlorure d'ammonium pour une solution de l'albuminoïde à 1/16 0/0 dans HCl à 1/16 0/00 ne monte que jusqu'à 0,430, au lieu de 0,543 dans le cas précédent, et ainsi de suite.

Dans le cas que nous venons d'examiner, le nombre d'ions dans le liquide qui nous a servi pour la dissolution de l'albuminoïde fut diminué par dilution avec de l'eau. Comme la concentration de l'albuminoïde diminuait en même temps, il y avait un facteur qui, agissant dans un autre sens, affaiblissait l'effet de la diminution de la quantité des ions. Mais nous avons un autre moyen d'abaisser le nombre des molécules ionisées, en prenant comme dissolvant un acide qui dissocie moins énergiquement que l'acide chlorhydrique. C'est le cas des acides organiques en général et de l'acide acétique en particulier.

Une solution à 1,6 0/00 de ce dernier acide, équimoléculaire avec celle de HCl à 1 0/00, présente un degré de dissociation égal à 0,025, c'est-à-dire que, sur quarante molécules en solution, une seule est décomposée en ions; différence, par conséquent, énorme avec l'acide chlorhydrique, où, sur 100 molécules, 95 étaient ionisées.

On peut donc prévoir que, pour précipiter l'albuminoïde en solution dans l'acide acétique à 1,6 0/00, il nous faudra moins de sel que dans le cas étudié au tableau I. Il est impossible malheureusement, pour l'exactitude des résultats de comparaison, d'obtenir avec ce dissolvant une solution de l'albuminoïde de *Picea excelsa* à 1 0/0, la quantité maximale qu'on en peut dissoudre étant voisine de 1/3 0/0, comme nous l'avons indiqué plus haut. La différence est d'ailleurs de peu d'importance et devrait plutôt augmenter la quantité de sel. Le résultat de l'expérience résumée dans le tableau V devient encore plus démonstratif.

On voit que les concentrations moléculaires de tous les sels mis à l'épreuve sont notablement diminuées par comparaison avec celles du tableau I. Pour le chlorure d'ammonium, elle est de 0,178 au lieu de 0,385; pour le bromure, 0,0836 au lieu de 0,230; pour le nitrate d'ammonium, 0,054 au lieu de 0,135, et ainsi de suite.

#### IV

ROLE DE LA MOBILITÉ DES IONS DANS LES PHÉNOMÈNES DE LA MODIFICATION D'ÉTAT DES ALBUMINOÏDES. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — RÉACTION DES ALBUMOSES AVEC L'ACIDE NITRIQUE

Voilà donc une série de faits qui concordent parfaitement

TABLEAU V

2 C. C.

*Picea excelsa.* Solution des alb. de réserve à 1/30,0 dans  $C_2H_4O_2$  à 1,0 0,00.

C.R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 40° C.			Température d'ébullition.			$\frac{b}{a}$
			V.R.	C <sup>0</sup> 0	C. M. a	V.R.	C <sup>0</sup> 0	C. M. b	
20 0 0	NH <sub>4</sub> Cl	53,52	0,10	0,952	0,178	0,22	4,98	0,370	2,08
"	NaCl	58,5	0,09	0,86	0,147	0,48	1,44	0,280	1,90
"	KCl	74,59	0,44	1,30	0,174	0,27	2,38	0,319	1,83
100,0	NH <sub>4</sub> Br	98,03	0,18	0,82	0,0836	0,33	2,09	0,213	2,34
"	NaBr	103,04	0,16	0,74	0,0718	0,44	1,80	0,175	2,3
"	KBr	119,4	0,20	0,91	0,0764	0,38	2,25	0,189	2,5
"	NaI	149,94	0,08	0,385	0,0256	0,29	1,26	0,084	3,3
"	HNO <sub>3</sub>	6 08	0,20	0,91	0,144	0,80	2,85	0,452	3,1
"	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80,44	0,09	0,43	0,054	0,30	1,30	0,162	3,0
"	KNO <sub>3</sub>	101,48	0,12	0,34	0,063	0,40	1,66	0,195	3,1
"	1/2 (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9,038	0,02	0,10	0,015	0,02	0,100	0,015 ?	1



bien avec l'hypothèse telle que nous l'avons formulée plus haut. Sous cette forme, elle est, cependant, loin d'expliquer tous les phénomènes en rapport avec les modifications d'état des albuminoïdes.

D'après notre hypothèse, ce sont les ions qui agissent comme dissolvants pour les albuminoïdes de réserve de *Picea excelsa*. Les sels en solutions étendues étant presque aussi fortement dissociés que les acides, on pourrait espérer de dissoudre ces albuminoïdes à l'aide des solutions faibles de sels. Pour certaines globulines comme celle du sérum sanguin, du blanc d'œuf, pour le fibrinogène, ceci est parfaitement exact; mais en est-il de même pour les albuminoïdes des graines de sapin rouge, qui sont insolubles; comme nous l'avons déjà vu, dans des solutions de sels alcalins à 10 0/0? Quelques essais faits pour élucider cette question m'ont montré qu'il est impossible de dissoudre une quantité sensible de ces albuminoïdes à l'aide de solutions faibles de sels. Comment expliquer ce fait qui semble en contradiction avec notre hypothèse?

Il est évident qu'il doit y avoir une différence entre les ions de l'acide chlorhydrique et des alcalis, qui dissolvent très facilement les matières protéiques du sapin rouge, et les ions des sels neutres. La chimie physique en connaît une, en effet. C'est la *conductibilité équivalente* ou la *mobilité* des ions qui représente la valeur réciproque de l'obstacle que les ions opposent au courant galvanique.

Voici cette valeur pour quelques ions positifs et négatifs, à la température de 18°, d'après Kohlrausch et Holborn.

H	NH <sub>4</sub>	Na	K	$\frac{1}{2}$ Mg	$\frac{1}{2}$ Sr	$\frac{1}{2}$ Ba
318	64,2	44,4	65,2	49,0	54,0	57,3
OH	Cl	Br	I	NO <sub>3</sub>	$\frac{1}{2}$ SO <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
174	65,9	66,9	66,7	60,8	69,7	33,7

On remarque de suite que la mobilité de l'hydrogène et de l'hydroxyle est représentée par des nombres de beaucoup supérieurs à ceux des autres ions.

Et comme nous voyons que les électrolytes, possédant dans leurs molécules des ions à grande mobilité, sont justement ceux dont les solutions étendues solubilisent les albuminoïdes de *Picea excelsa*, il nous semble indiqué d'introduire dans notre hypothèse encore cette notion que *les ions agissent d'autant plus*

*fortement sur la solubilisation des matières protéiques que leur mobilité est plus grande.*

Eh bien, cette notion va nous donner directement l'explication du fait qui nous a intrigué si longtemps, notamment la cause de l'action précipitante plus forte des sels de soude. La mobilité du sodium est de 44,4, celle du potassium 65,2 et celle de l'ammonium 64,2. La mobilité du sodium est donc plus faible, et l'action des ions de sodium, ajoutée à celle des ions de l'acide chlorhydrique, présentera une somme moindre de résistance à vaincre que l'addition des ions  $\text{NH}^+$  ou  $\text{K}$ , d'où la moindre quantité des molécules non dissociées nécessaire à la précipitation, et partant une concentration moléculaire du sel plus faible.

Nous avons vu également, dans le tableau 1, que la concentration moléculaire des chlorures de Mg, Sr et Ba va en augmentant (0,311; 0,366; 0,414). Or, la mobilité de ces éléments est respectivement 49; 54; 57,3. Mais la concentration moléculaire de ces sels à base alcalino-terreuse n'est pas directement comparable à celle des sels à base alcaline, parce que la dissociation dans le cas des électrolytes ternaires obéit à des lois plus compliquées et peu élucidées jusqu'ici. C'est pourquoi nous n'avons pas étendu nos expériences sur ces électrolytes dans les séries qui suivent.

\*  
\* \*

La notion sur l'influence de la mobilité des ions sur la solubilisation des albuminoïdes m'a inspiré une expérience que je n'aurais certes jamais entreprise, tellement elle va à l'encontre de ce qu'on enseigne généralement sur les phénomènes de coagulation des matières protéiques sous l'influence de la température.

Je me suis dit que si la précipitation des albuminoïdes de leurs solutions n'est qu'un état d'équilibre entre trois facteurs physico-chimiques, le nombre des ions, leur mobilité, et la quantité des molécules non dissociées, on devrait pouvoir facilement détruire cet équilibre en augmentant ou diminuant l'intensité d'un de ces facteurs.

En ajoutant de l'eau dans l'éprouvette où le précipité venait d'être provoqué à l'aide d'un sel ou d'un acide quelconque, on augmente le degré de dissociation électrolytique, on diminue,

par conséquent, le nombre des molécules non dissociées et on fait accroître celui des ions. Le précipité se redissout facilement.

Mais on peut aussi modifier la mobilité des ions, et ceci sans toucher au degré de dissociation. On sait, en effet, que la mobilité des ions augmente avec la température, tandis que la ionisation des électrolytes n'est presque pas modifiée par cet agent physique. Si l'on soumettait alors l'éprouvette où la précipitation venait d'être obtenue à l'échauffement, la mobilité des ions en présence et partant leur action solubilisante étant augmentée, on devrait assister à la dissolution du précipité. L'équilibre, qui existait avant que la température n'eût été élevée, aurait été rompu en faveur des solubilisateurs.

Ceci arrive, en effet, et, ce qui est encore plus intéressant, le précipité dissous réapparaît lorsque la température est ramenée au degré initial. Nous sommes aussi loin de la notion sur la coagulabilité des albuminoïdes en milieu acide et en présence des sels que de la théorie de la dénaturation. Si le précipité est entré en solution quand on a chauffé, ce n'est pas évidemment parce qu'il s'est transformé en acidalbumine sous l'influence de l'acide chlorhydrique et de la température — il n'aurait pas réapparu après refroidissement — mais bien parce que nous avons élevé momentanément l'action d'un agent solubilisant.

Pour neutraliser cet effet, on n'a qu'à ajouter encore du sel pour augmenter le nombre des molécules non dissociées qui, grâce à leur fonction antagoniste, arrivent à contrebalancer l'influence de la température.

Aussi voyons-nous qu'à chaque température correspond une concentration moléculaire définie des sels à ajouter pour la précipitation, et cette concentration s'élève avec la température. Nous ne communiquons dans ce travail que les nombres obtenus à la température d'ébullition. On les trouvera dans les parties droites des tableaux I et V.

On y remarque les mêmes régularités que pour les nombres déterminés à la température de 8 à 10° C. Les sels de chaque acide ont une concentration très voisine, les sels de sodium présentent toujours le minimum, et, ce qui est surtout remarquable, le rapport  $b/a$  entre les concentrations moléculaires à la température d'ébullition et à celle de 8 à 10° est aussi très voisin pour les sels du même acide. Ce rapport est partout supérieur

à l'unité : il est, en moyenne, égal à 1,60 pour les chlorures, à 1,94 pour les bromures, à 3,02 pour les nitrates et à 2,63 pour les sulfates, dans le cas des albuminoïdes de *Picea excelsa* en solution dans l'acide chlorhydrique. Il est indéfiniment grand pour l'acide sulfurique, ce qui veut dire qu'il est impossible de précipiter ces albuminoïdes à l'aide de l'acide sulfurique à 100 0 à la température d'ébullition, en n'ajoutant pas plus de 2 c. c. de ce réactif, suivant la règle que nous nous sommes imposée pour ces recherches. Il est, d'ailleurs, impossible de réaliser la précipitation à cette température, même avec de l'acide sulfurique plus concentré.

Il est évident que si l'on avait ajouté, pour précipiter à froid les albuminoïdes, un grand excès d'acide ou de sel, de façon à dépasser même la concentration moléculaire nécessaire à la température d'ébullition, l'élévation de la température ne provoquerait pas la dissolution. C'est à cette circonstance qu'il faut attribuer ce fait que la propriété des albuminoïdes que nous venons de décrire a échappé pendant si longtemps à la sagacité des spécialistes.

Et cependant, ce phénomène n'est pas absolument inconnu. On sait, depuis les recherches de M. Kühne sur les produits de digestion pepsique des albuminoïdes, que l'acide nitrique, ajouté avec précaution à une solution des albumoses, donne un précipité qui se dissout à la température d'ébullition et réapparaît après refroidissement.

La constatation n'ayant été qu'empirique, on n'a pas tardé de regarder le phénomène comme une réaction spécifique en quelque sorte pour les protalbumoses.

Lorsque M. Kossel<sup>1</sup> a découvert, en 1884, l'histone, et lui a trouvé entre autres la réaction avec l'acide nitrique, il n'a pas hésité à regarder cette nouvelle matière comme un membre de la grande famille des albumoses, possédant par conséquent une constitution chimique plus simple que les albuminoïdes ordinaires. Il est vrai qu'il a changé d'avis depuis. L'histone est actuellement pour cet auteur plutôt un corps complexe, une combinaison de la protamine avec un albuminoïde quelconque<sup>2</sup>.

1. Ueber einen peptonartigen Bestandtheil des Zellkernes, *Zeitsch. f. physiol. Ch.*, T. VIII, p. 514.

2. Ueber die Lymphzellen, *Deutsche med. Wochenschrift*, 1894, p. 146.



M. Palladine, au cours de son travail sur les albuminoïdes d'origine végétale, a cherché entre autres à vérifier l'affirmation des auteurs anglais sur l'existence des albumoses dans les graines de semence. En appliquant les règles élaborées par l'école de M. Kühne pour l'isolement de ces matières, il n'a obtenu que des résultats négatifs. Comme il a remarqué que les albuminoïdes isolés par lui donnaient la réaction avec l'acide nitrique, il a pensé mettre d'accord tout le monde, en déclarant que les graines ne contiennent que des vitellines ressemblant, par quelques-unes de leurs réactions, aux albumoses.

Or, la réaction avec l'acide nitrique, comme nous l'avons vu précédemment, n'est qu'un cas spécial d'un phénomène plus général qu'on peut provoquer avec tous les acides minéraux et même les sels. Elle n'a rien à voir ni avec la constitution chimique plus ou moins complexe des albuminoïdes, ni avec leur origine végétale, puisque nous la retrouverons plus loin aussi chez l'albumine d'œuf. Elle n'est due, répétons-le encore une fois, qu'à l'augmentation temporaire de la mobilité des ions sous l'influence de la température.

Les développements de cette conception feront l'objet d'un prochain mémoire.

---

# SUR LA « TRISTEZA »

PAR J. LIGNIÈRES

Chef des travaux à l'École vétérinaire d'Alfort, chargé de mission par l'Institut Pasteur.

---

Sous le nom de « Tristeza » on connaît, dans la République Argentine et dans l'Uruguay, une maladie des bovidés absolument identique à la fièvre du Texas, si bien étudiée aux États-Unis par Smith et Kilborne.

Pendant la durée de ma mission en Argentine, l'étude de cette affection a été l'un de mes principaux objectifs; je me suis astreint à en refaire complètement l'étude.

Mon travail, publié à Buenos-Aires par les soins de l'association des Hacendados<sup>1</sup>, peut se résumer ainsi qu'il suit : on va voir que si je confirme un grand nombre de faits connus, j'en apporte un certain nombre de nouveaux d'une réelle importance.

Des conclusions de Smith et Kilborne, je confirme, entre autres points :

1° La spécificité du *Piroplasma bigeminum*;

2° L'altération des globules rouges comme cause principale des lésions et des symptômes observés;

3° L'inoculabilité de la maladie aux bovidés par injections sous-cutanées ou intra-veineuses du sang ou de la pulpe des viscères ou des tissus vasculaires;

4° La transmission de la maladie par les tiques;

5° Le danger qu'il y a à faire passer les animaux des zones indemnes dans les zones infectées;

6° La virulence possible du sang des animaux élevés dans les zones infectées, même quand ils sont sains en apparence, et celle des tiques qu'ils hébergent;

7° La sensibilité des bovidés adultes et la presque indifférence des très jeunes à l'action du *Piroplasma*;

1. Ce travail vient aussi de paraître dans la *Revista Veterinaria* de Buenos-Aires.

8° La non inoculabilité de la Tristeza aux lapins, cobayes, moutons et pigeons.

Avec Nicolle et Adil Bey, j'ai constaté la persistance du piroplasma dans les tissus des bovidés infectés depuis longtemps.

Je fais voir en outre :

A. Que l'immunité consécutive à une première atteinte est très solide.

B. Que l'examen du sang, quoique étant l'élément le plus important du diagnostic *ante-mortem*, reste parfois en défaut.

C. Qu'en effet, il existe une forme atypique de la maladie dans laquelle la perte globulaire est peu accentuée ou tout à fait tardive, et où les globules de la grande circulation ne sont pas envahis par le *Piroplasma* ou le sont seulement à l'approche de la mort.

D. Que cette forme ne correspond pas à la maladie bénigne; dans cette dernière, en effet, l'infection globulaire et la destruction des hématies s'accusent dès le début du mal, tout en restant peu importantes.

E. Que la forme bénigne n'est pas causée par des hématozoaires punctiformes, comme le pensaient Smith et Kilborne, mais toujours par le *Piroplasma* type.

A tous ces faits, j'ajoute encore :

a). Des données nouvelles sur l'évolution du *Piroplasma bigeminum*;

b). La culture à l'étuve du *Piroplasma bigeminum* sous sa forme ronde;

c). Un essai de l'interprétation raisonnée de l'immunité et du rôle intime des tiques;

d). La manière d'être de la « Tristeza » dans la République Argentine;

e). L'inefficacité absolue des compositions quinquiques ou arsénicales comme moyen préventif ou curatif<sup>1</sup>.

Enfin, depuis la publication de mon travail, j'ai réussi à

1. J'ai administré la quinine à doses massives, jusqu'à 30 grammes, par le tube digestif et surtout par injection sous-cutanée. J'ai répété deux, trois et quatre fois les injections, même au point de vue préventif, sans jamais constater une action quelconque soit sur le parasite, soit sur la marche de la maladie.

Si van Hellen a obtenu de bons résultats, c'est ou bien qu'il a eu justement affaire, au moment de ses essais, à des formes qui eussent guéri toutes seules, ou bien que l'affection qui frappe les bœufs en Finlande est différente de la fièvre du Texas et de la « Tristeza ».

obtenir l'atténuation du *Piroplasma bigeminum* et la vaccination pratique contre la Tristeza.

Je ne puis évidemment pas ici développer, même sommairement, tous les points que je viens d'indiquer. Ce serait beaucoup trop long. Je demande cependant la permission de m'arrêter un instant sur l'évolution et la culture du *Piroplasma bigeminum*, et sur la vaccination contre la Tristeza.

Lorsqu'on examine du sang infecté : 1° à l'état frais sur la platine chauffante ; 2° sur des préparations colorées, surtout par la méthode de Laveran, et faites à des temps variables après la prise, voici ce qu'on constate :

Le *Piroplasma* endoglobulaire piriforme, unique ou bigéminé, prend rapidement une forme ronde par rétraction du protoplasma et ne tarde pas à sortir du globule. Si le sang examiné est extrêmement riche en parasites, on peut trouver des formes en poire, libres dans le sérum et munies d'un *flagellum* à leur partie effilée.

Dans le sang conservé purement à l'étuve, après vingt-quatre heures, presque tous les parasites sont arrondis, paraissent plus petits et se colorent mieux par le bleu de méthylène. A partir de ce moment, il faut toujours examiner des préparations colorées.

On sait qu'à l'aide de l'excellente méthode préconisée par M. Laveran, on met très facilement en évidence, dans les formes en poire (1<sup>er</sup> stade), une masse chromatique qu'il a décrite avec M. Nicolle sous le nom de karyosome. Or au moment où le parasite vient de prendre la forme ronde (2<sup>e</sup> stade), on ne réussit généralement plus à colorer ce karyosome ; il semble bien s'être échappé hors du *Piroplasma*.

Les jours suivants, et parfois dans les 36-48 heures, la masse chromatique se reforme dans le parasite rond, puis se divise par scissiparité en 2, 3, 4 et même 5 petits éléments dont beaucoup sont d'un volume plus restreint que n'importe lequel des microbes colorables connus (3<sup>e</sup> stade).

Jusqu'ici, j'ai vainement cherché à voir la division du protoplasma suivre celle des petites masses chromatiques pour donner de nouveaux parasites. J'ai vu, au contraire, chacun de ces petits éléments chromatiques devenir libre, soit avant, soit surtout après la destruction plus ou moins lente du protoplasma du parasite ; il est probable qu'ils se sont entourés d'une



même couche protoplasmique; mais jusqu'ici il m'a été difficile de la distinguer avec sûreté.

Il est important de noter qu'après leur mise en liberté, les petites masses chromatiques peuvent encore se diviser par scissiparité.

*J'ai pu suivre toutes ces transformations dans l'estomac de la Tigre.*

A mon avis, ce sont ces petits éléments libres qui, jetés comme des graines hors du parasite, sont chargés de perpétuer l'espèce. Ils représentent ainsi une forme de résistance; c'est la raison pour laquelle je les ai désignés sous le nom de spores ou de germes, à défaut d'autre nom plus approprié.

Je ne veux pas nier qu'il puisse exister une autre évolution; celle que je viens de décrire est normale; elle se fait dans l'organisme même des malades.

On peut obtenir de la façon suivante une véritable prolifération du *Piroplasma bigeminum*. Lorsqu'on dispose d'un sang très riche en hématozoaires, on en recueille purement une certaine quantité qui est défibrinée à l'abri de toute souillure, puis distribuée dans 20 ou 40 tubes à essais stérilisés, lesquels sont ensuite placés à l'étuve ou laissés à la température du laboratoire. Les jours suivants, on examine après coloration le fond des tubes. Dans la plupart des tubes, on constate que les hématozoaires disparaissent peu à peu; mais dans quelques autres on voit au contraire se dérouler l'évolution décrite plus haut. Après 10, 20, 30 jours au plus, on obtient une prolifération évidente des masses chromatiques, qui deviennent très nombreuses, libres, puis constituent les germes.

En réensemencant le fond de cette première culture, dans un autre tube contenant du sérum fortement hémoglobiné, j'ai vu la prolifération continuer à se faire jusqu'à la cinquième culture.

La troisième culture, c'est-à-dire le troisième réensemencement dans le sérum hémoglobiné, m'a donné une prolifération remarquable du parasite.

Là j'ai vu les germes grossir, former une petite masse arrondie, analogue au parasite rond précédemment indiqué, dans l'intérieur de laquelle apparaissait bientôt une masse chromatique qui, mise en liberté, donnait rapidement un nouveau parasite rond.

Le plus souvent, il y avait deux germes dans chaque parasite.

Jamais je n'ai constaté de forme en poire ; celle-ci doit être particulière aux parasites endoglobulaires.

Je n'ai pas besoin de dire que ce développement du *Piroplasma bigeminum* ne réussit dans aucun des milieux de culture ordinaires, bouillons, gélose, gélatine, pas même sur le sang coagulé.

Aujourd'hui je puis donner la « Tristeza » avec des cultures de ce genre datant de 50 et 60 jours ; des essais ultérieurs pourront sans doute reculer encore ces limites.

Pour ce qui est de l'atténuation du *Piroplasma bigeminum*, je ne puis en ce moment indiquer exactement comment je procède ; toutefois je crois pouvoir dire en substance que le succès de mes recherches sur ce point est dû :

1<sup>o</sup> A l'emploi d'un sang dont la grande richesse en hématozoaires est toujours sensiblement constante. Ce virus est obtenu à la suite d'une série de passages par le bœuf ;

2<sup>o</sup> A ce fait que le *Piroplasma bigeminum* ne passe pas brusquement de la vie à la mort, mais peut subir des atténuations de sa virulence, pendant lesquelles son inoculation confère l'immunité.

Je me sers pour vacciner d'une culture dans le sang défibriné des malades. Ce sang contient bien le *Piroplasma* vivant, car, inoculé en quantité convenable à un bœuf, il peut lui donner la Tristeza ; nous n'avons donc pas affaire seulement à un sérum.

Avant mes propres recherches, on a préconisé en Australie et au Texas des vaccinations contre la fièvre du Texas. Elles consistent à injecter sous la peau 5 c. c. de sang défibriné de malades guéris depuis peu.

Dans ces conditions le sang a une composition dont on n'est pas maître. Parfois il contient des hématozoaires capables de donner la maladie mortelle ; d'autres fois il ne contient pas d'hématozoaires, ou il en contient si peu qu'il peut ne transmettre ni la maladie ni l'immunité. L'étude détaillée que j'ai faite du sang des animaux guéris explique bien ces phénomènes.

Je ne veux pas dire que ce procédé ne puisse donner aucun résultat utile dans la pratique ; mais je le considère comme pouvant être dangereux, surtout pour les animaux de race pure. J'en ai fait l'expérience. En effet l'immunité n'est acquise qu'à

la faveur d'une attaque bénigne du mal, c'est-à-dire après l'apparition de signes extérieurs appréciables. Or rien n'est plus fréquent que de dépasser cette limite et de provoquer une affection grave. Au contraire, avec la méthode que je préconise, on peut obtenir une vaccination véritable à la suite de laquelle l'animal ne présente aucun symptôme apparent.

Voici le résumé de deux expériences publiques instituées pour démontrer l'efficacité de cette vaccination.

1<sup>o</sup> Expériences de Buenos-Aires, suivies par une Commission présidée par M. le ministre de l'Agriculture de la République Argentine.

Deux sous-commissions étaient chargées, l'une des recherches microscopiques, l'autre des examens cliniques des animaux.

Le 13 avril, la commission choisit 11 animaux dans un lot de 25 bovidés provenant de localités indemnes de « Tristeza ».

Sur ce nombre, 8 reçoivent dans la jugulaire une petite quantité de vaccin dilué et n'éprouvent de ce fait aucun malaise. Deux autres, inoculés avec du sang virulent pour montrer la sensibilité des animaux à la maladie, prirent régulièrement la forme grave; l'un d'eux mourut. Enfin le dernier, qui avait reçu 1 c. c. de vaccin dans la jugulaire pour montrer la présence du piroplasma vivant dans ce vaccin, prit la maladie et guérit.

Le 30 avril, 7 des bovidés vaccinés le 13 avril, plus deux taureaux vaccinés depuis quatre mois et quatre témoins, reçurent sous la peau 10 c. c. de sang très virulent; de plus le huitième vacciné et un cinquième témoin furent couverts de jeunes tiques écloses au laboratoire et provenant de localités infectées. Huit jours après, les quatre témoins étaient morts, après avoir présenté une température très élevée, de l'hémoglobinurie, une grande quantité d'hématozoaires dans les globules, une énorme diminution du nombre des hématies, et toutes les lésions de la « Tristeza » à l'autopsie.

Aucun des vaccinés n'a paru malade. Des animaux couverts de Tiques, le vacciné restait bien portant, tandis que le témoin était malade dès le 10 mai et mourait le 18 du même mois.

2<sup>o</sup> Expériences d'Alfort, suivies par une commission de la Société centrale de Médecine Vétérinaire et par plusieurs membres de l'Institut Pasteur.

Le 5 juillet un bœuf et une vache sont vaccinés par injection intraveineuse; par la suite ils ne montrent aucun malaise appréciable.

Le 15 du même mois, ces deux vaccinés, ainsi que deux vaches ayant présenté un et deux mois avant une forme bénigne de la maladie, sont inoculés par M. Nocard avec 5 c. c. de sang virulent injecté sous la peau. Un bœuf témoin reçoit la même inoculation.

Dès le 21, la température du bœuf témoin augmente de deux degrés, elle atteint 40°,4; ses globules sont encore en nombre normal, 8,000,000.

Le 22, la température est à 40°,7, l'urine est rouge, on trouve facilement des hématozoaires, l'animal est triste, complètement inappétent. A 11 heures du matin, il a 3,200,000 globules rouges par m. c. A 4 heures, on en compte seulement 1,100,000. Les autres bovidés vont très bien.

Le 23, l'hémoglobinurie est très intense, le sérum du sang, les hématozoaires sont nombreux.  $T = 41^{\circ},2$ ; on ne compte plus que 370,000 globules. Le sujet semble sur le point de mourir; il est très faible, sans aucun appétit.

Le 24, l'état du malade semble s'être amélioré; le soir, la température descend à 38,3, les hématozoaires deviennent rares, l'urine est encore un peu rouge.

Le 25, l'urine est de teinte normale; la température est de 38°,4; le malade, quoique extrêmement faible et amaigri, prend le chemin de la convalescence.

Les autres bovidés n'ont présenté à aucun moment le plus petit signe de maladie, la température est restée parfaitement normale ainsi que la composition du sang et les grandes fonctions<sup>1</sup>.

1. Pour plus de détails consultez encore :

*La Tristeza en la República Argentina.* Revista Veterinaria, Enero 31 a Mayo 31 de 1900.

*Expériences de vaccination contre la Tristeza faites à Alfort.* Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire. Séances des 12 et 26 juillet 1900.

*Sur la Tristeza.* Comptes rendus du Congrès international de médecine 1900.

*Expériences officielles de vaccination contre la Tristeza à Buenos-Aires.* Recueil de médecine vétérinaire, n°s du 15 octobre et suivants, 1900.

*La Tristeza dans la République Argentine.* Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire, n°s du 30 novembre et suivants, 1900.



## LÉGENDE DE LA PLANCHE VI

FIG. 1. — *Piroplasma bigeminum*.  
Forme en poire.

FIG. 2. — *Piroplasma bigeminum*.  
Sous différents aspects.

FIG. 3. — *Piroplasma bigeminum*.  
Forme ronde.

FIG. 4. — *Piroplasma bigeminum*.  
Forme ronde.

FIG. 5. — *Piroplasma bigeminum*.  
Formation des germes.

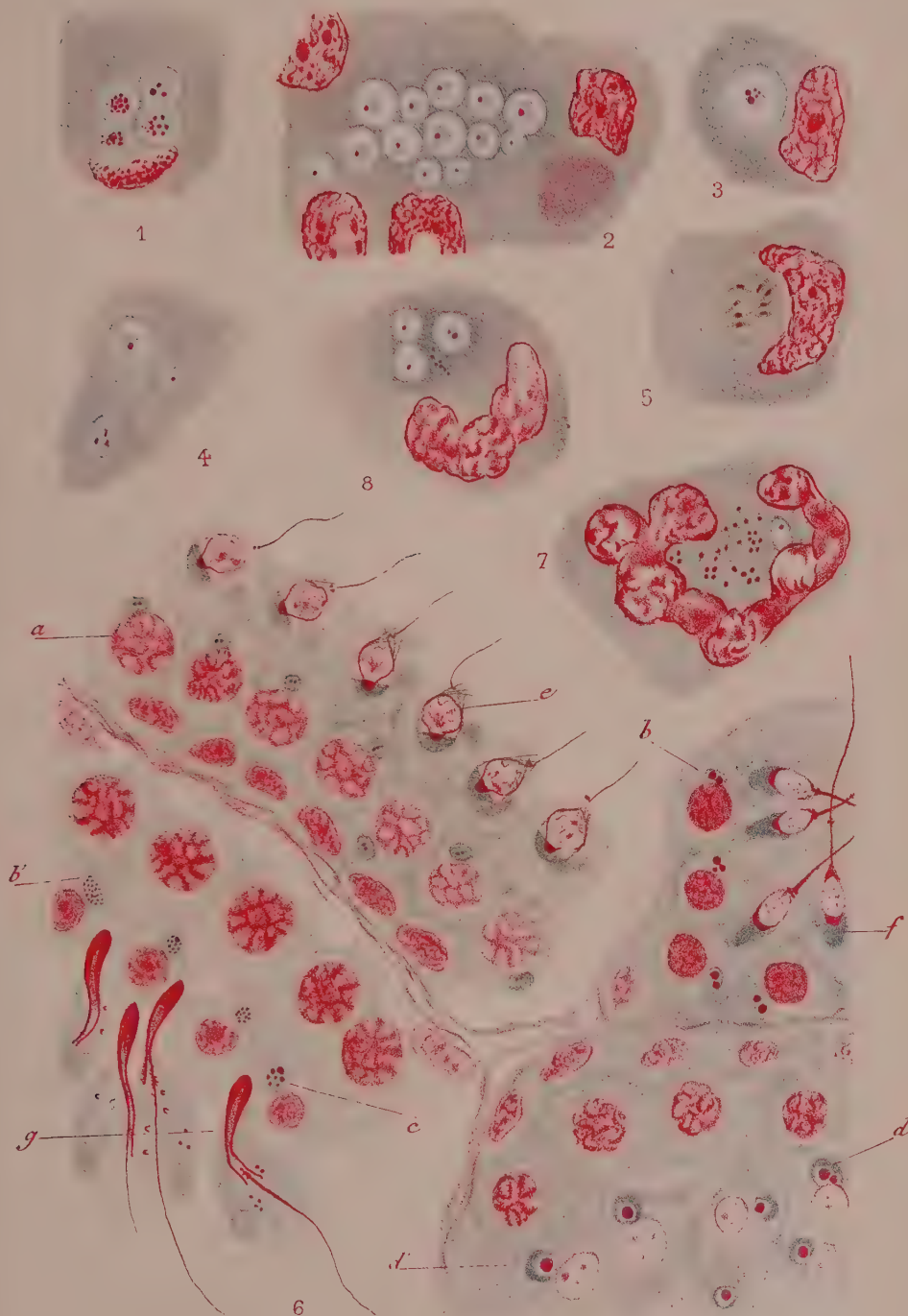
FIG. 6. — *Piroplasma bigeminum*.  
Culture artificielle en sérum hémoglobinique.

---

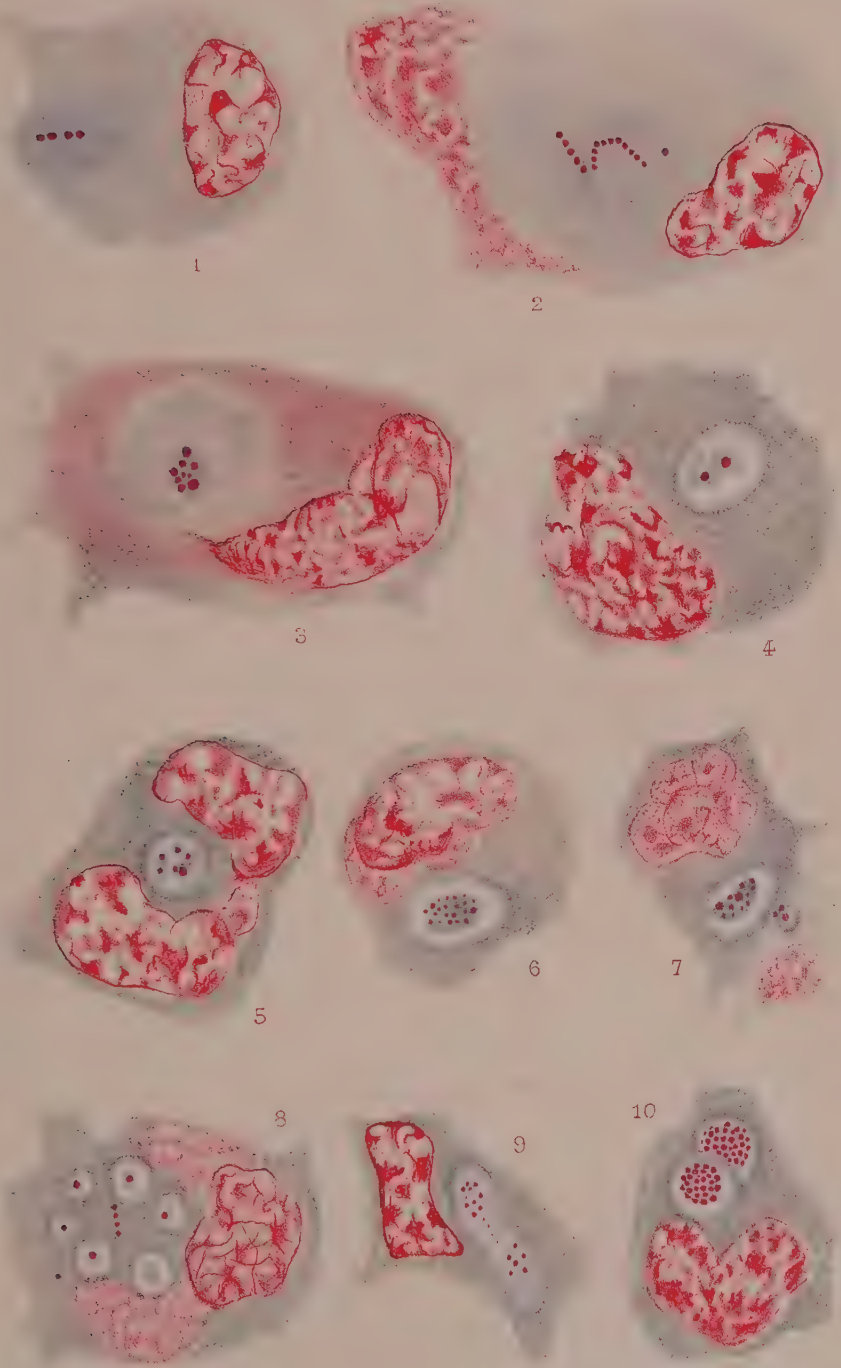
Le Gérant : G. MASSON.

---

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.





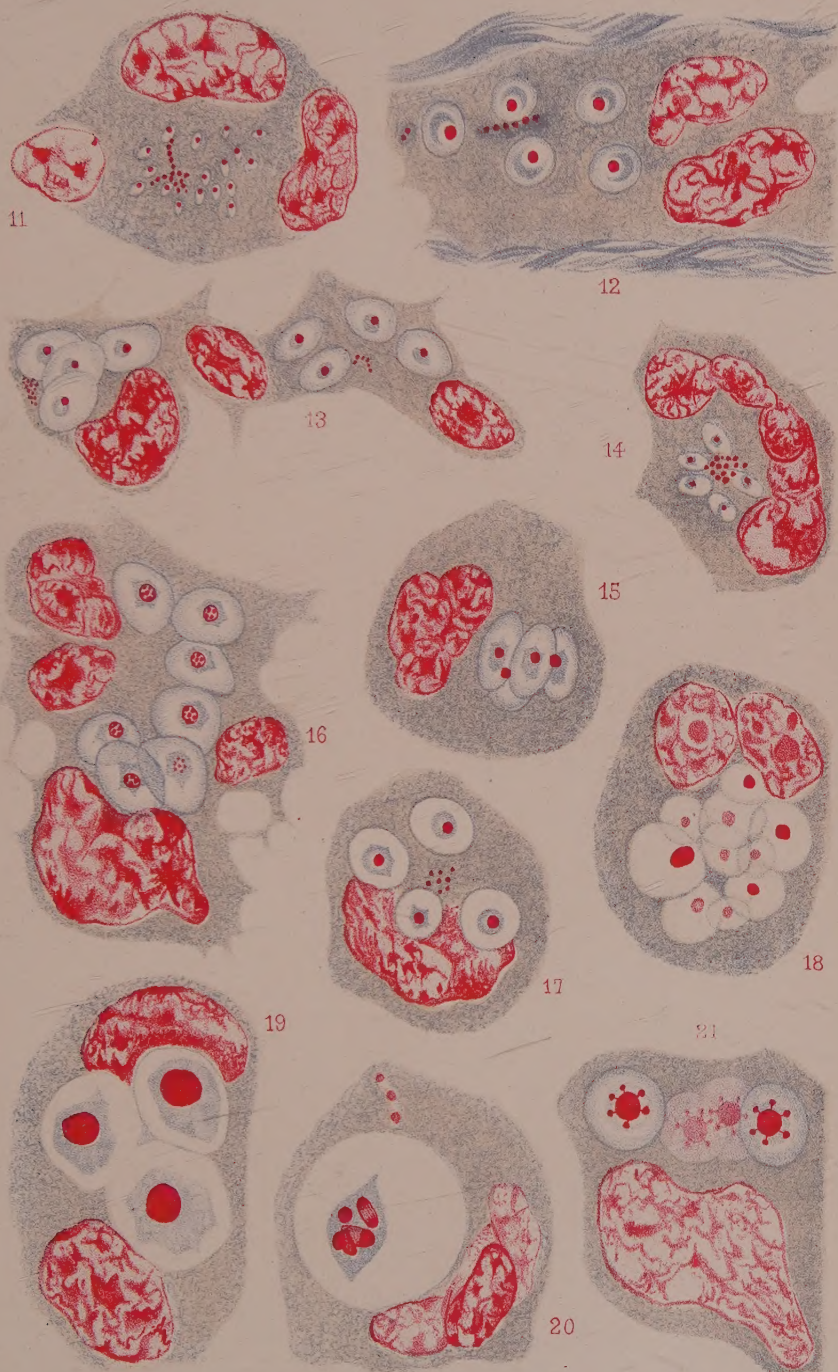


D<sup>r</sup> Borrel, del.

V. Roussel, lith.

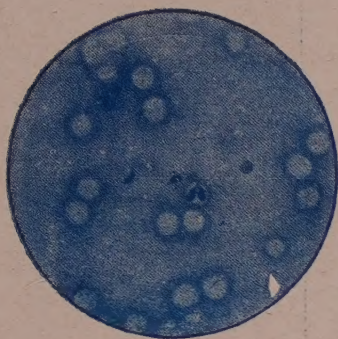




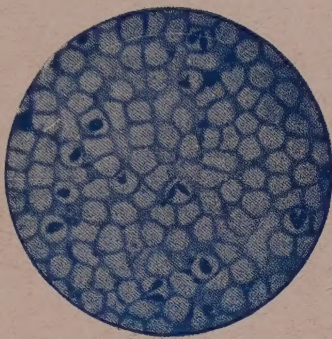




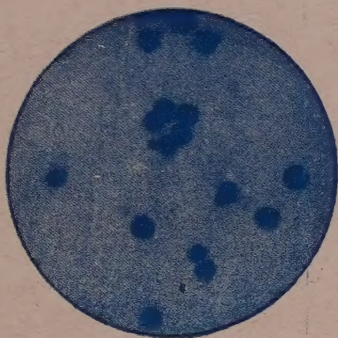




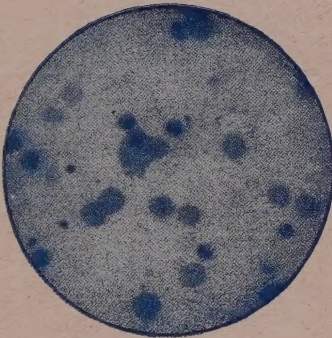
1



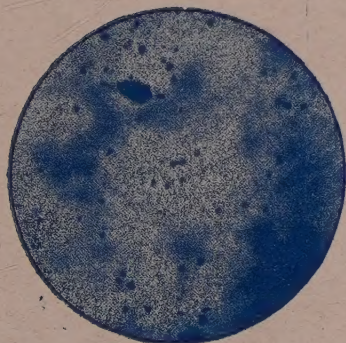
2



3



4



5



6



11. 12

ANNUAL REPORT OF THE BOARD OF DIRECTORS